

# ***Arzneimittel als Umweltrisiko?***

## ***Ökotoxikologische Untersuchung und Risikobewertung für vier in der aquatischen Umwelt nachgewiesene Pharmaka***

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe - Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Gerrit Nentwig  
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2006  
(D30)

*Arzneimittel als Umweltrisiko?*

*Ökotoxikologische Untersuchung und  
Risikobewertung für vier in der aquatischen Umwelt  
nachgewiesene Pharmaka*

Gerrit Nentwig  
Frankfurt am Main

*Aus meines Herzens Grunde  
Sag' ich dir Lob und Dank  
In dieser Morgenstunde,  
Dazu mein Leben lang,  
O Gott, in deinem Thron,  
Dir zu Preis, Lob und Ehren  
Durch Christum, unsern Herren,  
Dein'n eingebornen Sohn.*

*Dein'n Engel laß auch bleiben  
Und weichen nicht von mir,  
Den Satan zu vertreiben,  
Auf daß der bö's' Feind hier  
In diesem Jammertal  
Sein' Tück' an mir nicht übe,  
Leib und Seel' nicht betrübe  
Und bring' mich nicht zu Fall.*

*(Georg Nigidus, 1585)*

## Inhalt

	Seite
A) Inhaltsverzeichnis	I
B) Verzeichnis der Abbildungen	IV
C) Verzeichnis der Tabellen	IX
D) Abkürzungsverzeichnis	XI
E) Abstract	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Medikamentenrückstände in der Umwelt	1
1.2 Risikobewertung von Xenobiotika und Relevanz der Versuchsorganismen	4
1.3 Kenntnisstand und Ziel der Arbeit	7
2 Material und Methoden	11
2.1 Versuchssubstanzen	11
2.2 Auswahl von Sediment und Nährstoffen	17
2.3 Versuchsorganismen: Bezug und Haltung	17
2.4 Versuchsaufbau	25
2.4.1 Akuttest mit <i>Chironomus riparius</i> und <i>Lumbriculus variegatus</i>	25
2.4.2 Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i>	25
2.4.3 Reproduktionstest mit <i>Lumbriculus variegatus</i>	27
2.4.4 Reproduktionstest mit <i>Potamopyrgus antipodarum</i>	28
2.4.5 Destruentenmikrokosmostest	29
2.5 Statistik	30
2.6 Rückstandsanalytik	31
2.6.1 Carbamazepin	31
2.6.2 Clofibrinsäure	32
2.6.3 Ciprofloxacin	32
2.6.4 Fluoxetin	33
3 Ergebnisse	34
3.1 <i>Chironomus riparius</i>	34
3.1.1 Carbamazepin	34
3.1.2 Clofibrinsäure	50
3.1.3 Ciprofloxacin	54
3.1.4 Fluoxetin	58
3.2 <i>Potamopyrgus antipodarum</i>	62
3.2.1 Carbamazepin	62
3.2.2 Clofibrinsäure	69
3.2.3 Ciprofloxacin	74
3.2.4 Fluoxetin	78
3.3 <i>Lumbriculus variegatus</i>	85
3.3.1 Ernährungsversuch	85
3.3.2 Carbamazepin	87

3.3.3	Clofibrinsäure	88
3.3.4	Ciprofloxacin	89
3.3.5	Fluoxetin	92
3.4	Destruentenmikrokosmos	94
3.4.1	Carbamazepin	95
3.4.2	Clofibrinsäure	98
3.4.3	Ciprofloxacin	101
3.4.4	Fluoxetin	103
3.5	Rückstandsanalytik	105
3.6	Effektkonzentrationen	108
a)	Carbamazepin	109
b)	Fluoxetin	109
3.7	Akuttoxizität	109
4	Diskussion	111
4.1	Auswahl der Testsubstanzen	111
4.1.1	Relevanz im Kontext der gesamten Arzneimittelfracht	111
4.1.2	Wichtigkeit im Gesamtarzneimittelverbrauch	113
4.1.3	Therapeutische Relevanz	114
4.1.4	Auswahl der Konzentrationsbereiche	116
4.2	Carbamazepin	117
4.2.1	Emergenz <i>C. riparius</i>	117
4.2.2	Mortalität <i>C. riparius</i>	118
4.2.3	Gelegezahl und Zahl der Eier pro Gelege bei <i>C. riparius</i>	119
4.2.4	Vermehrung <i>L. variegatus</i>	119
4.2.5	Embryonenzahl <i>P. antipodarum</i>	121
4.2.6	Mortalität <i>P. antipodarum</i>	122
4.3	Clofibrinsäure	122
4.3.1	Emergenz <i>C. riparius</i>	122
4.3.2	Mortalität <i>C. riparius</i>	123
4.3.3	Gelegezahl <i>C. riparius</i>	123
4.3.4	Vermehrung <i>L. variegatus</i>	123
4.3.5	Mortalität <i>L. variegatus</i>	124
4.3.6	Embryonenzahl <i>P. antipodarum</i>	124
4.4	Ciprofloxacin	125
4.4.1	Emergenz <i>C. riparius</i>	125
4.4.2	Mortalität <i>C. riparius</i>	126
4.4.3	Gelegezahl <i>C. riparius</i>	126
4.4.4	Vermehrung <i>L. variegatus</i>	126
4.4.5	Embryonenzahl <i>P. antipodarum</i>	128
4.5	Fluoxetin	129
4.5.1	Emergenz <i>C. riparius</i>	129
4.5.2	Mortalität <i>C. riparius</i>	129
4.5.3	Gelegezahl <i>C. riparius</i>	129
4.5.4	Vermehrung <i>L. variegatus</i>	130
4.5.5	Embryonenzahl <i>P. antipodarum</i>	130
4.5.6	Mortalität <i>P. antipodarum</i>	132
4.6	Destruentenmikrokosmos	133
4.7	Analyseergebnisse	135

4.8 Mögliche Umweltrisiken	136
4.8.1 Risk Assessment und Relevanz für die Freilandsituation	136
4.8.2 Exposition und Effekte	137
4.8.3 Persistenz der untersuchten Substanzen	140
4.8.4 Ökologische Relevanz, mögliche Konsequenzen, Möglichkeiten zur Vermeidung von Medikamentenemissionen	141
4.8.5 Arzneimittelrückstände als Umweltrisiko unter Berücksichtigung der ermittelten Daten	146
4.8.6 Ausblick	148
4.8.6.1 Verbesserung der angewandten Methoden	148
4.8.6.2 Weitere Forschung zu Pharmaka in der Umwelt	149
4.8.7 Eignung der Versuchstiere und Testsysteme	150
5 Zusammenfassung	152
6 Literaturverzeichnis	154
7 Danksagung	167
8 Lebenslauf	169
9 Anhang	171

## Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung	Seite
<b>Abb. 2.1.</b> Strukturformel von Carbamazepin	12
<b>Abb. 2.2.</b> Strukturformel von Clofibrinsäure	13
<b>Abb. 2.3.</b> Strukturformel von Ciprofloxacin	14
<b>Abb. 2.4.</b> Strukturformel von Fluoxetin	16
<b>Abb. 2.5.</b> Lebenszyklus von <i>Chironomus riparius</i>	18
<b>Abb. 2.6.</b> Männliches Imago und Larven (viertes Stadium) von <i>Chironomus riparius</i>	19
<b>Abb. 2.7.</b> <i>Lumbriculus variegatus</i>	20
<b>Abb. 2.8.</b> <i>Potamopyrgus antipodarum</i>	21
<b>Abb. 2.9.</b> Brutraum <i>Potamopyrgus antipodarum</i> (nach FRETTER & GRAHAM 1994)	21
<b>Abb. 2.10.</b> <i>Blepharisma japonicum</i>	22
<b>Abb. 2.11.</b> <i>Tetrahymena</i> sp. (Aufnahmen aus dem Internet)	24
<b>Abb. 2.12.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i>	27
<b>Abb. 2.13.</b> Reproduktionstest mit <i>Lumbriculus variegatus</i>	27
<b>Abb. 2.14.</b> Reproduktionstest mit <i>Potamopyrgus antipodarum</i>	28
<b>Abb. 2.15.</b> Destruentenmikrokosmos	29
<b>Abb. 3.1.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Carbamazepin. Serie I. Emergenz	34
<b>Abb. 3.2.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Carbamazepin. Serie I. A): Schlupfverlauf B): EmT <sub>50</sub> gesamt C): EmT <sub>50</sub> , getrennt nach Männchen und Weibchen	35
<b>Abb. 3.3.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Carbamazepin. Serie I. A): Gelege pro Weibchen B): Zahl der Eier pro Gelege C): Summe der Gelege pro Behandlungsstufe	37
<b>Abb. 3.4.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Carbamazepin. Serie II. Emergenz	38
<b>Abb. 3.5.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Carbamazepin. Serie II. A): Schlupfverlauf B): EmT <sub>50</sub> gesamt C): EmT <sub>50</sub> , getrennt nach Männchen und Weibchen	39
<b>Abb. 3.6.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Carbamazepin. Serie II. A): Gelege pro Weibchen B): Zahl der Eier pro Gelege C): Summe der Gelege pro Behandlungsstufe	41
<b>Abb. 3.7.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Carbamazepin. Serie III. Emergenz	42
<b>Abb. 3.8.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Carbamazepin. Serie III. A): Schlupfverlauf B): EmT <sub>50</sub> gesamt C): EmT <sub>50</sub> , getrennt nach Männchen und Weibchen	43
<b>Abb. 3.9.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Carbamazepin. Serie III. A): Gelege pro Weibchen B): Zahl der Eier pro Gelege C): Summe der Gelege pro Behandlungsstufe	45
<b>Abb. 3.10.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Carbamazepin. Serie IV. Emergenz im Lebenszyklustest und Geschlechterverhältnis.	46
<b>Abb. 3.11.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Carbamazepin. Serie IV. A): Schlupfverlauf B): EmT <sub>50</sub> gesamt C): EmT <sub>50</sub> , getrennt nach Männchen und Weibchen	47

Abbildung	Seite
<b>Abb. 3.12.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Carbamazepin. Serie III. A): Gelege pro Weibchen B): Zahl der Eier pro Gelege C): Summe der Gelege pro Behandlungsstufe	49
<b>Abb. 3.13.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Clofibrinsäure. Emergenz und Geschlechterverhältnis	50
<b>Abb. 3.14.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Clofibrinsäure. A): Schlupfverlauf B): EmT <sub>50</sub> gesamt C): EmT <sub>50</sub> , getrennt nach Männchen und Weibchen	51
<b>Abb. 3.15.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Clofibrinsäure. A): Gelege pro Weibchen B): Zahl der Eier pro Gelege C): Summe der Gelege pro Behandlungsstufe	53
<b>Abb. 3.16.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Ciprofloxacin. Emergenz	54
<b>Abb. 3.17.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Ciprofloxacin. A): Schlupfverlauf B): EmT <sub>50</sub> gesamt C): EmT <sub>50</sub> , getrennt nach Männchen und Weibchen	55
<b>Abb. 3.18.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Ciprofloxacin. A): Gelege pro Weibchen B): Zahl der Eier pro Gelege C): Summe der Gelege pro Behandlungsstufe	57
<b>Abb. 3.19.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Fluoxetin. Emergenz	58
<b>Abb. 3.20.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Ciprofloxacin. A): Schlupfverlauf B): EmT <sub>50</sub> gesamt C): EmT <sub>50</sub> , getrennt nach Männchen und Weibchen	59
<b>Abb. 3.21.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Fluoxetin. A): Gelege pro Weibchen B): Zahl der Eier pro Gelege C): Summe der Gelege pro Behandlungsstufe	61
<b>Abb. 3.22.</b> Reproduktionstest mit <i>Potamopyrgus antipodarum</i> , Testsubstanz: Carbamazepin. Embryonenzahlen zu Versuchsbeginn	62
<b>Abb. 3.23.</b> Reproduktionstest mit <i>Potamopyrgus antipodarum</i> , Testsubstanz: Carbamazepin. Auswertung t7 A): Gesamtzahl der Embryonen B): Anzahl beschalter Embryonen C): Anzahl unbeschalter Embryonen	63
<b>Abb. 3.24.</b> Reproduktionstest mit <i>Potamopyrgus antipodarum</i> , Testsubstanz: Carbamazepin. Auswertung t14 A): Gesamtzahl der Embryonen B): Anzahl beschalter Embryonen C): Anzahl unbeschalter Embryonen	65
<b>Abb. 3.25.</b> Reproduktionstest mit <i>Potamopyrgus antipodarum</i> , Testsubstanz: Carbamazepin. Auswertung t21 A): Gesamtzahl der Embryonen B): Anzahl beschalter Embryonen C): Anzahl unbeschalter Embryonen	66
<b>Abb. 3.26.</b> Reproduktionstest mit <i>Potamopyrgus antipodarum</i> , Testsubstanz: Carbamazepin. Auswertung t28 A): Gesamtzahl der Embryonen B): Anzahl beschalter Embryonen C): Anzahl unbeschalter Embryonen	68
<b>Abb. 3.27.</b> Reproduktionstest mit <i>Potamopyrgus antipodarum</i> , Testsubstanz: Clofibrinsäure. Embryonenzahlen zu Versuchsbeginn	69
<b>Abb. 3.28.</b> Reproduktionstest mit <i>Potamopyrgus antipodarum</i> , Testsubstanz: Clofibrinsäure. Auswertung t14 A): Gesamtzahl der Embryonen B): Anzahl beschalter Embryonen C): Anzahl unbeschalter Embryonen	70



Abbildung	Seite
<b>Abb. 3.29.</b> Reproduktionstest mit <i>Potamopyrgus antipodarum</i> , Testsubstanz: Clofibrinsäure. Auswertung t28 A): Gesamtzahl der Embryonen B): Anzahl beschalter Embryonen C): Anzahl unbeschalter Embryonen	71
<b>Abb. 3.30.</b> Reproduktionstest mit <i>Potamopyrgus antipodarum</i> , Testsubstanz: Clofibrinsäure. Auswertung t56 A): Gesamtzahl der Embryonen B): Anzahl beschalter Embryonen C): Anzahl unbeschalter Embryonen	73
<b>Abb. 3.31.</b> Reproduktionstest mit <i>Potamopyrgus antipodarum</i> , Testsubstanz Ciprofloxacin. Embryonenzahlen zu Versuchsbeginn	74
<b>Abb. 3.32.</b> Reproduktionstest mit <i>Potamopyrgus antipodarum</i> , Testsubstanz: Ciprofloxacin. Auswertung t14 A): Gesamtzahl der Embryonen B): Anzahl beschalter Embryonen C): Anzahl unbeschalter Embryonen	75
<b>Abb. 3.33.</b> Reproduktionstest mit <i>Potamopyrgus antipodarum</i> , Testsubstanz Ciprofloxacin. Auswertung t28 A): Gesamtzahl der Embryonen B): Anzahl beschalter Embryonen C): Anzahl unbeschalter Embryonen	76
<b>Abb. 3.34.</b> Reproduktionstest mit <i>Potamopyrgus antipodarum</i> , Testsubstanz Ciprofloxacin. Auswertung t56 A): Gesamtzahl der Embryonen B): Anzahl beschalter Embryonen C): Anzahl unbeschalter Embryonen	77
<b>Abb. 3.35.</b> Reproduktionstest mit <i>Potamopyrgus antipodarum</i> , Testsubstanz Fluoxetin. Embryonenzahlen zu Versuchsbeginn	78
<b>Abb. 3.36.</b> Reproduktionstest mit <i>Potamopyrgus antipodarum</i> , Testsubstanz Fluoxetin. Auswertung t14 A): Gesamtzahl der Embryonen B): Anzahl beschalter Embryonen C): Anzahl unbeschalter Embryonen	79
<b>Abb. 3.37.</b> Reproduktionstest mit <i>Potamopyrgus antipodarum</i> , Testsubstanz Fluoxetin. Auswertung t21 A): Gesamtzahl der Embryonen B): Anzahl beschalter Embryonen C): Anzahl unbeschalter Embryonen	81
<b>Abb. 3.38.</b> Reproduktionstest mit <i>Potamopyrgus antipodarum</i> , Testsubstanz Fluoxetin. Auswertung t28 A): Gesamtzahl der Embryonen B): Anzahl beschalter Embryonen C): Anzahl unbeschalter Embryonen	82
<b>Abb. 3.39.</b> Reproduktionstest mit <i>Potamopyrgus antipodarum</i> , Testsubstanz Fluoxetin. Auswertung t56 A): Gesamtzahl der Embryonen B): Anzahl beschalter Embryonen C): Anzahl unbeschalter Embryonen	84
<b>Abb. 3.40:</b> Reproduktionstest mit <i>Lumbriculus variegatus</i> . Überprüfung verschiedener Kohlenstoffquellen. A): Gesamtzahl der Würmer in allen Versuchsansätzen B): Zahl der ausgewachsenen Würmer C): Zahl der neugebildeten Würmer D): Biomasse pro Wurm	86
<b>Abb. 3.41:</b> Reproduktionstest mit <i>Lumbriculus variegatus</i> . Testsubstanz Carbamazepin A): Gesamtzahl der Würmer in allen Versuchsansätzen B): Zahl der ausgewachsenen Würmer C): Zahl der neugebildeten Würmer D): Biomasse pro Wurm	87
<b>Abb. 3.42:</b> Reproduktionstest mit <i>Lumbriculus variegatus</i> . Testsubstanz Clofibrinsäure A): Gesamtzahl der Würmer in allen Versuchsansätzen B): Zahl der ausgewachsenen Würmer C): Zahl der neugebildeten Würmer D): Biomasse pro Wurm	88

Abbildung	Seite
<b>Abb. 3.43:</b> Reproduktionstest mit <i>Lumbriculus variegatus</i> . Testsubstanz Ciprofloxacin, Serie I A): Gesamtzahl der Würmer in allen Versuchsansätzen B): Zahl der ausgewachsenen Würmer C): Zahl der neugebildeten Würmer D): Biomasse pro Wurm	90
<b>Abb. 3.44:</b> Reproduktionstest mit <i>Lumbriculus variegatus</i> . Testsubstanz Ciprofloxacin, Serie II A): Gesamtzahl der Würmer in allen Versuchsansätzen B): Zahl der ausgewachsenen Würmer C): Zahl der neugebildeten Würmer D): Biomasse pro Wurm	91
<b>Abb. 3.45:</b> Reproduktionstest mit <i>Lumbriculus variegatus</i> . Testsubstanz Fluoxetin A): Gesamtzahl der Würmer in allen Versuchsansätzen B): Zahl der ausgewachsenen Würmer C): Zahl der neugebildeten Würmer D): Biomasse pro Wurm	93
<b>Abb. 3.46:</b> Reproduktionstest mit <i>Lumbriculus variegatus</i> . Testsubstanz: Fluoxetin Deformierte Würmer	94
<b>Abb. 3.47:</b> Reproduktionstest mit <i>Lumbriculus variegatus</i> . Lückenhaft gefüllter Magen-Darmtrakt	94
<b>Abb. 3.48:</b> Mikrokosmos-Test mit <i>Blepharisma japonicum</i> und <i>Tetrahymena thermophila</i> . Testsubstanz: Carbamazepin. Zahl von <i>Blepharisma</i> in Kontrolle und allen Behandlungsstufen. A: Versuchsbeginn 15.07.2004 B: Versuchsbeginn 16.08.2004 C: Versuchsbeginn 30.08.2004 D: Versuchsbeginn 13.09.2004	95
<b>Abb. 3.49:</b> Mikrokosmos-Test mit <i>Blepharisma japonicum</i> und <i>Tetrahymena thermophila</i> . Testsubstanz Carbamazepin. Zelldichten von <i>Tetrahymena</i> in Kontrolle und allen Behandlungsstufen. A: Versuchsbeginn 15.07.2004 B: Versuchsbeginn 16.08.2004 C: Versuchsbeginn 30.08.2004 D: Versuchsbeginn 13.09.2004	97
<b>Abb. 3.50:</b> Mikrokosmos-Test mit <i>Blepharisma japonicum</i> und <i>Tetrahymena thermophila</i> . Testsubstanz: Clofibrinsäure. Zahlen von <i>Blepharisma</i> in Kontrolle und allen Behandlungsstufen. A: Versuchsbeginn 19.09.2004 B: Versuchsbeginn 07.11.2004 C: Versuchsbeginn 13.12.2004	99
<b>Abb. 3.51:</b> Mikrokosmos-Test mit <i>Blepharisma japonicum</i> und <i>Tetrahymena thermophila</i> . Testsubstanz: Clofibrinsäure. Zelldichten von <i>Tetrahymena</i> in Kontrolle und allen Behandlungsstufen. A: Versuchsbeginn 19.09.2004 B: Versuchsbeginn 07.11.2004 C: Versuchsbeginn 13.12.2004	100

Abbildung	Seite
<b>Abb. 3.52:</b> Mikrokosmos-Test mit <i>Blepharisma japonicum</i> und <i>Tetrahymena thermophila</i> . Testsubstanz: Ciprofloxacin. Anzahlen von <i>Blepharisma</i> in Kontrolle und allen Behandlungsstufen. A: Versuchsbeginn 04.10.2004 B: Versuchsbeginn 19.12.2004	101
<b>Abb. 3.53:</b> Mikrokosmos-Test mit <i>Blepharisma japonicum</i> und <i>Tetrahymena thermophila</i> . Testsubstanz: Ciprofloxacin. Zelldichten von <i>Tetrahymena</i> in Kontrolle und allen Behandlungsstufen. A: Versuchsbeginn 04.10.2004 B: Versuchsbeginn 19.12.2004	103
<b>Abb. 3.54:</b> Mikrokosmos-Test mit <i>Blepharisma japonicum</i> und <i>Tetrahymena thermophila</i> . Testsubstanz: Fluoxetin. Zahlen von <i>Blepharisma</i> in Kontrolle und allen Behandlungsstufen. A: Versuchsbeginn 01.06.2004 B: Versuchsbeginn 05.07.2004	104
<b>Abb. 3.55:</b> Mikrokosmos-Test mit <i>Blepharisma japonicum</i> und <i>Tetrahymena thermophila</i> . Testsubstanz: Fluoxetin. Zelldichten von <i>Tetrahymena</i> in Kontrolle und allen Behandlungsstufen. A: Versuchsbeginn 01.06.2004 B: Versuchsbeginn 05.07.2004	105

## Verzeichnis der Tabellen

Tabelle	Seite
<b>Tabelle 2.1.</b> Physikalische Eigenschaften der Versuchssubstanzen	11
<b>Tabelle 3.1.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Carbamazepin. Serie I. Geschlechterverhältnis	36
<b>Tabelle 3.2.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Carbamazepin. Serie I. Für die Gelege ermittelte Parameter	36
<b>Tabelle 3.3.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Carbamazepin. Serie II. Geschlechterverhältnis im Lebenszyklustest.	40
<b>Tabelle 3.4.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Carbamazepin. Serie II. Für die Gelege ermittelte Parameter	40
<b>Tabelle 3.5.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Carbamazepin. Serie III. Geschlechterverhältnis im Lebenszyklustest.	44
<b>Tabelle 3.6.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Carbamazepin. Serie III. Für die Gelege ermittelte Parameter	44
<b>Tabelle 3.7.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Carbamazepin. Serie IV. Geschlechterverhältnis im Lebenszyklustest.	48
<b>Tabelle 3.8.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Carbamazepin. Serie IV. Für die Gelege ermittelte Parameter	48
<b>Tabelle 3.9.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Clofibrinsäure. Geschlechterverhältnis im Lebenszyklustest.	52
<b>Tabelle 3.10.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Clofibrinsäure. Für die Gelege ermittelte Parameter	52
<b>Tabelle 3.11.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Ciprofloxacin. Geschlechterverhältnis im Lebenszyklustest.	56
<b>Tabelle 3.12.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Ciprofloxacin. Für die Gelege ermittelte Parameter	56
<b>Tabelle 3.13.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Fluoxetin. Geschlechterverhältnis im Lebenszyklustest.	60
<b>Tabelle 3.14.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> , Testsubstanz Fluoxetin. Für die Gelege ermittelte Parameter	60
<b>Tabelle 3.15.</b> Mikrokosmos-Test mit <i>Blepharisma japonicum</i> und <i>Tetrahymena thermophila</i> . Testsubstanz: Carbamazepin. Behandlungsstufen mit signifikant zur Lösemittelkontrolle verschiedenen <i>Blepharisma</i> -Zahlen (One-Way-Anova mit Dunnett's Multiple-Comparison-Test).	96
<b>Tabelle 3.16.</b> Mikrokosmos-Test mit <i>Blepharisma japonicum</i> und <i>Tetrahymena thermophila</i> . Testsubstanz: Carbamazepin. Generationszeiten von <i>Blepharisma japonicum</i> .	96
<b>Tabelle 3.17.</b> Mikrokosmos-Test mit <i>Blepharisma japonicum</i> und <i>Tetrahymena thermophila</i> . Testsubstanz: Clofibrinsäure. Behandlungsstufen mit signifikant zur Lösemittelkontrolle verschiedenen <i>Blepharisma</i> -Zahlen (One-Way-Anova mit Dunnett's Multiple-Comparison-Test).	98
<b>Tabelle 3.18.</b> Mikrokosmos-Test mit <i>Blepharisma japonicum</i> und <i>Tetrahymena thermophila</i> . Testsubstanz: Clofibrinsäure. Generationszeiten von <i>Blepharisma japonicum</i>	98
<b>Tabelle 3.19.</b> Mikrokosmos-Test mit <i>Blepharisma japonicum</i> und <i>Tetrahymena thermophila</i> . Testsubstanz: Ciprofloxacin. Behandlungsstufen mit signifikant zur Lösemittelkontrolle verschiedenen <i>Blepharisma</i> -Zahlen (One-Way-Anova mit Dunnett's Multiple-Comparison-Test).	102

Tabelle	Seite
<b>Tabelle 3.20.</b> Mikrokosmos-Test mit <i>Blepharisma japonicum</i> und <i>Tetrahymena thermophila</i> . Testsubstanz: Ciprofloxacin. Generationszeiten von <i>Blepharisma japonicum</i>	102
<b>Tabelle 3.21.</b> Mikrokosmos-Test mit <i>Blepharisma japonicum</i> und <i>Tetrahymena thermophila</i> . Testsubstanz: Fluoxetin. Generationszeiten von <i>Blepharisma japonicum</i>	104
<b>Tabelle 3.22.</b> 28-d-Sedimenttoxizitätstest mit <i>Chironomus riparius</i> (Serie I). Gemessene Carbamazepinkonzentrationen an Tag 0 und Tag 28 im Sediment sowie Verhältnis der End- zur Ausgangskonzentration (Bestimmungsgrenze in Wasser: 2 ng/L; in Sediment: 2 µg/kg dw).	106
<b>Tabelle 3.23.</b> 30-d-Sedimenttoxizitätstest mit <i>Chironomus riparius</i> (Serie III). Gemessene Carbamazepinkonzentrationen an Tag 0 in Sediment und Überstandswasser (Bestimmungsgrenze in Wasser: 2 ng/L; in Sediment: 2 µg/kg dw).	106
<b>Tabelle 3.24.</b> 30-d-Sedimenttoxizitätstest mit <i>Chironomus riparius</i> (Serie III). Gemessene Carbamazepinkonzentrationen an Tag 0 in Sediment und Überstandswasser (Bestimmungsgrenze in Wasser: 2 ng/L; in Sediment: 2 µg/kg dw).	107
<b>Tabelle 3.25.</b> 28 d-Reproduktionstest mit <i>Potamopyrgus antipodarum</i> . Gemessene Fluoxetinkonzentrationen, direkt und 24, 48 und 72 h nach Wasserwechsel (Bestimmungsgrenze in Wasser: 1 µg/L).	107
<b>Tabelle 3.26.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> . Ermittelte Konzentrationen von Fluoxetin in Wasser und Sediment am Tag 0. (Bestimmungsgrenze: 1 µg/l in Wasser und Sedimentextrakt)	108
<b>Tabelle 3.27.</b> Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> . Ermittelte Konzentrationen von Fluoxetin in Wasser und Sediment am Tag 30 (Bestimmungsgrenze: 1 µg/l in Wasser und Sedimentextrakt).	108
<b>Tabelle 3.28.</b> Toxizitätskenndaten für Carbamazepin im Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i>	109
<b>Tabelle 3.29.</b> Toxizitätskenndaten für Fluoxetin im Reproduktionstest mit <i>Potamopyrgus antipodarum</i>	109
<b>Tabelle 3.30.</b> Test auf akute Toxizität mit <i>Chironomus riparius</i> und <i>Lumbriculus variegatus</i> . Testkonzentrationen	109
<b>Tabelle 3.31.</b> Test auf akute Toxizität mit <i>Chironomus riparius</i> und <i>Lumbriculus variegatus</i> . Ermittelte LC <sub>50</sub>	110
<b>Tabelle 4.1.</b> PEC/PNEC-Quotienten der Testsubstanzen	136
<b>Tabelle 4.2.</b> Wahrscheinliche Sedimentkonzentrationen (PEC <sub>sed</sub> ) der untersuchten Pharmaka	145

## Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin
<i>B. japonicum</i>	<i>Blepharisma japonicum</i>
BCF	Biokonzentrationsfaktor
BG	Bestimmungsgrenze
C	Kontrolle
<i>C. riparius</i>	<i>Chironomus riparius</i>
cAMP	Zyklisches Adenosin-Monophosphat
CAS-Nr.	Chemical Abstract Service-Nr.
DAB	Deutsches Arzneibuch
DDD	Definierte Tagesdosis (Defined Daily Dose)
DIN	Deutsches Institut für Normung
EC <sub>10</sub>	Konzentration, bei der 10% des untersuchten Effekts auftritt
EC <sub>50</sub>	Konzentration, bei der 50% des untersuchten Effekts auftritt
ECB	European Chemicals Bureau
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGZ	Embryonen-Gesamtzahl
EMS	Embryonen mit Schale
EmT <sub>50</sub>	mittlere Emergenzzeit; Zeitraum, in dem 50% der eingesetzten Tiere schlüpfen
EoS	Embryonen ohne Schale
EU	Europäische Union
FDA	Food and Drug Administration (amerikanische Arzneimittelbehörde)
Fluoxetin-HCl	Fluoxetinhydrochlorid
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography (Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
<i>L. variegatus</i>	<i>Lumbriculus variegatus</i>
LC <sub>50</sub>	Konzentration, bei der 50% aller Versuchsorganismen sterben
LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie)
LD <sub>50</sub>	Dosis, bei der 50% aller Versuchsorganismen sterben
LDL	Low-Density-Lipoproteine
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration (niedrigste gegenüber der Lösemittelkontrolle signifikante Konzentration, bei der ein Effekt beobachtet wird)
log K <sub>oc</sub>	Logarithmus des Verteilungskoeffizienten, der sich auf den organischen Kohlenstoffgehalt bezieht
log KOW/ log POW	Logarithmus des 1-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten

LOQ	Limit of Quantification (Quantifizierungsgrenze)
MEC	Measured Environmental Concentration (gemessene Umweltkonzentration)
MW	Mittelwert
n. d.	nicht analysiert
NOEC	No Observed Effect Concentration (höchste Testkonzentration, bei der kein statistisch signifikanter Effekt beobachtet wird)
OECD	Organisation of Economic Cooperation and Development (Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung)
<i>P. antipodarum</i>	<i>Potamopyrgus antipodarum</i>
PEC	Predicted Environmental Concentration (vorhergesagte Umweltkonzentration)
PNEC	Predicted No Effect Concentration (Konzentration, bei der keine Schädigung von Organismen zu erwarten ist)
pKa	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
rcf	relative Zentrifugalbeschleunigung
SC	Lösemittelkontrolle
SD	Standardabweichung
SPE	Festphasenextraktion
SRI	Serotonin Reuptake Inhibitor (Serotonin Wiederaufnahme-Hemmer)
SSRI	Selective Serotonin Reuptake Inhibitor (selektiver Serotonin Wiederaufnahme-Hemmer)
Stabw	Standardabweichung
t	Zeit
<i>T. thermophila</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>
TG	Trockengewicht
TGD	Technical Guidance Document
VLDL	Very-Low-Density-Lipoproteine (Low-Density-Lipoproteins)
WSK	Wahrscheinliche Sedimentkonzentration

## Abstract

A great number of pharmaceuticals can be detected in ground and surface waters. Concerns about the introduction of pharmaceutical residues into the environment arose already 50 years ago (DEMOLL 1954) and first detections date from the 1970s and 1980s (HIGNITE & AZARNOFF 1977, RICHARDSON & BOWRON 1985). Although the concentrations of pharmaceuticals in surface waters are sometimes quite high (up to 2,1 µg/l for carbamazepine in the Rhine in 1996, SACHER ET AL. 1998), nearly nothing is known about potential environmental hazards.

Present data about ecotoxicity derive almost exclusively from acute tests under laboratory conditions, making it difficult to extrapolate detected toxic effects from the laboratory to environmental conditions. Additionally, little is known about sediment contamination by pharmaceuticals. Present data about the occurrence of pharmaceuticals are acquired by measurements in the water compartment.

The aim of the present Ph. D. Thesis was to assess the chronic effects of four frequently detected pharmaceuticals, the antiepileptic agent carbamazepine, the lipid lowering agent clofibric acid, the antibiotic ciprofloxacin and the antidepressant fluoxetine.

Effects were assessed on the non-biting midge *Chironomus riparius*, the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* and the aquatic annelid *Lumbriculus variegatus*. *C. riparius* and *L. variegatus* were exposed via sediment, thereby assessing the importance of this exposure pathway. Additionally, effects on the destruent food web were assessed using a protist microcosm with the ciliates *Blepharisma japonicum* and *Tetrahymena thermophila*.

While clofibric acid and ciprofloxacin did not show any significant effects, carbamazepine and fluoxetine proved to be harmful. Carbamazepine inhibited the development of *C. riparius*. The EC<sub>10</sub> was calculated to 0.11 µg/kg sediment (dry weight). Fluoxetine drastically reduced the embryo numbers in *P. antipodarum* with an EC<sub>10</sub> of 0.81 µg/l. These concentrations are environmentally relevant and the PEC/PNEC-ratios are >1. The protist microcosm did not show any effects.

These results are interesting in several ways, one the one hand because they are the first effects of non-hormone pharmaceuticals detected at environmentally relevant concentrations and on the other hand because the risk assessment was carried with measured environmental concentrations, not with predicted concentrations.

The results indicate that pharmaceuticals can even at very low concentrations be environmentally relevant and may pose an ecotoxicological risk. More data are needed to estimate the hazards of these residues and efforts to limit the introduction of pharmaceuticals and to remove residues from sewage are strongly needed.



# 1. Einleitung

## 1.1 Medikamentenrückstände in der Umwelt

Bis vor wenigen Jahren galt das Hauptaugenmerk bei der Reinigung kommunaler Abwässer den in hohen Mengen vorkommenden Nitraten, Phosphaten und Tensiden. Nachdem hier in den vergangenen zehn Jahren fast durchgängig Verbesserungen zu beobachten waren (HLUG 2004), rücken nunmehr weniger auffällige Fremdstofffrachten in den Blickpunkt des Interesses. Hierunter fällt die Belastung der Gewässer mit Rückständen von Humanpharmaka. Erste Befürchtungen über solche Belastungen wurden schon vor langer Zeit geäußert (DEMOLL 1954). Während sich die Arbeit von Demoll jedoch ausschließlich mit Veterinärpharmaka befasste, richtet sich das Augenmerk heute besonders auf Humanarzneimittel. In den 1970er und 1980er Jahren erfolgten erste Bestimmungen in Oberflächengewässern. GARRISON ET AL. (1976) wiesen in unbehandeltem Abwasser 0,8 µg/l Clofibrinsäure nach, in Wasserproben aus Belebtschlammbecken bis zu 2,0 µg/l. HIGNITE & AZARNOFF (1977) berichteten über Nachweise von Clofibrinsäure und Salicylsäure als Metabolit von Acetylsalicylsäure im Auslauf einer Kläranlage, es wurden durchschnittlich 7,09 µg/l Clofibrinsäure und 28,79 µg/l Salicylsäure gemessen, dies entspricht Tagesfrachten von 2,13 kg beziehungsweise 8,64 kg. RICHARDSON & BOWRON (1985) berichten in einer Übersichtsarbeit über Nachweise von insgesamt 186 Substanzen im Oberflächenwasser, darunter Carbamazepin mit 0,44 µg/l, Clofibrinsäure mit 6,3 µg/l und Ethinylöstradiol mit 3 ng/l. ROGERS ET AL. (1986) identifizierten Clofibrinsäure, Ibuprofen und Naproxen im Ablauf der Kläranlage von Iona Island, Kanada. Ein weiterer bemerkenswerter Fund war die eher zufällige Bestimmung von Clofibrinsäure in Grundwasser (STAN & LINKERHÄGNER 1992). HEBERER & STAN (1997) wiesen Clofibrinsäure auch im Berliner Trinkwasser nach. In den folgenden Jahren mehrten sich entsprechende Befunde und es erfolgten verstärkt Nachweise von Pharmakarückständen in Oberflächengewässern (STUMPF ET AL. 1996A, B, TERNES 1998, BELFROID ET AL. 1999, SATTELBERGER 1999, HEBERER ET AL. 2002, KOLPIN ET AL. 2002, BOYD ET AL. 2003, CALAMARI ET AL. 2003).

Der Grund für das zunehmende Vorkommen ist nicht etwa illegale Entsorgung, sondern die Tatsache, dass zahlreiche Wirkstoffe in Medikamenten gegen biologischen Abbau resistent sind. Der Eintrag von Pharmaka in die aquatische Umwelt erfolgt vornehmlich durch die Ausscheidungen von Patienten. Sie werden somit nach Einnahme weitgehend unverändert wieder ausgeschieden und auch in den Kläranlagen unvollständig eliminiert (MÖHLE ET AL. 1999, TERNES ET AL. 1999, WEGENER ET AL. 1999, TERNES 2000B). Zwar sind manche Substanzen wie Acetylsalicylsäure nach Kläranlagenpassage nicht mehr nachweisbar, doch zahlreiche andere werden nicht abgebaut (TERNES 1998). Somit werden die Verordnungsmengen (Carbamazepin: 76 t in 2003, SCHWABE & PAFFRATH 2004) fast zu 100% in die Umwelt abgegeben, teils unverändert, teils als aktive Metabolite. Carbamazepin wird in Kläranlagen nicht eliminiert (TERNES 1998). Es kann daher mit einem jährlichen Carbamazepineintrag von über 70 t gerechnet werden.

Bis heute liegen jedoch nur wenige Informationen über mögliche Umwelteffekte durch Pharmakarückstände vor, insbesondere fehlen Angaben über chronische Effekte (OETKEN ET AL. 2005). Untersuchungen zu solchen Effekten erscheinen angesichts der steigenden Zahl von gefundenen Medikamenten geboten. Es liegen bereits Hinweise auf Bioakkumulation von Pharmaka in Fischen vor (BROOKS 2004, PERSÖNLICHE MITTEILUNG). Zudem kann die Toxizität einzelner Pharmaka durch Mischtoxizität in einem Substanzgemisch erhöht werden. Angesichts der Vielzahl gefundener Medikamente (TERNES 1998) erscheinen solche Effekte denkbar. Bekanntestes Beispiel für die Effekte von Medikamenten in der aquatischen Um-

welt ist 17- $\beta$ -Ethinylöstradiol. ROUTLEDGE ET AL. (1998) zeigten durch diese Substanz hervorgerufene, verweiblichende Effekte auf Fische bereits bei Konzentrationen von 1 ng/l; dabei handelt es sich um umweltrelevante Konzentrationen.

Die Betrachtung von Medikamenten als Umweltschadstoffe stellt zudem ein besonderes Problem dar, da es sich in vielen Fällen als unmöglich gestaltet, die Belastungssituation durch eine Regulation der jeweiligen Substanz zu erleichtern. So ist Carbamazepin unter den vorhandenen Antiepileptika immer noch das meistverordnete Medikament (FEELY 1999). Von den untersuchten Substanzen ist nur Clofibrinsäure vom Markt verschwunden, da sich die Therapie hoher Blutfettwerte mit Fibraten als kaum wirksam erwies (SCHWABE & PAFFRATH 2004). Für andere in der Umwelt aufgefundene Medikamente ist eine derartige Entwicklung bislang nicht abzusehen. Das ebenfalls nachgewiesene Diclofenac (TERNES 1998) etwa ist uneingeschränkt in Gebrauch und von anerkanntem therapeutischen Nutzen. Zudem sind Medikamente in der öffentlichen Meinung fast ausschließlich positiv besetzt. Frühere Umweltbelastungen waren durch ihre gravierenden Folgen leicht wahrzunehmen; die auslösenden Stoffe, etwa Schwermetalle, waren zudem allseits als Gifte anerkannt. Medikamente hingegen werden weitgehend als Heilmittel wahrgenommen. Substanzverbote als Weg zur Verringerung der Umweltbelastung, wie etwa im Fall der Bleibemengung in Benzin, kommen hier nicht in Frage.

Die Überprüfung von nur im Spurenbereich vorkommenden Substanzen zeigt, in welchem Maße sich die Probleme der Umweltforschung gewandelt haben. Frühere Umweltbelastungen, etwa die Salzbelastung von Flüssen in Kaliabbaugebieten oder der Eintrag von Schwermetallen, lösten zum einen direkt toxische Effekte aus, zum anderen bewegten sich die Schadstofffrachten in anderen Größenordnungen. Schwermetalle beispielsweise wurden und werden in stark belasteten Flüssen in Konzentrationen von mehreren hundert Milligramm pro Liter gemessen (HLUG 2004). Zugleich haben sich auch die in der Umwelt beobachteten Probleme gewandelt. Während die Belastungen früherer Tage direkte toxische Effekte nach sich zogen, zu Massensterben von Fischen führten und für Wochen oder dauerhaft weite Teile der aquatischen Fauna absterben ließen, sind die heute beobachtbaren Effekte von anderer Dimension.

Es wurde bereits auf die durch Östrogene verursachten Effekte eingegangen. Diese und andere durch Hormone und hormonmimetische Substanzen bewirkte Effekte, die so genannte endokrine Disruption, machten zum ersten Mal die neuen Dimensionen aktueller Umweltbelastungen deutlich. Im Vordergrund stehen nun nicht mehr die direkt toxischen und weithin sichtbaren Effekte, sondern Veränderungen, die auf das Individuum nicht unmittelbar letal wirken. Speziell Effekte auf das Sexualhormonsystem von Mollusken (endokrine Disruption) sind ein weltweites Problem, da sie durch in Schiffsanstrichen verwendete Substanzen, vor allem Organozinnverbindungen, hervorgerufen wird. Benutzt wurden diese Substanzen zur Verminderung des Muschelbewuchses an Schiffen. Es zeigte sich jedoch, dass sie aus den Anstrichen auslaugen und zudem hochgradig persistent sind. Auch diese Verbindungen kommen mit Konzentrationen von 1,5  $\mu$ g/l (Tributylzinn, WALDOCK ET AL. 1987) in weit geringerer Konzentration vor als beispielsweise Schwermetalle, sind jedoch auch in diesen Konzentrationen hochwirksam. Durch die Veränderung der Geschlechtsorgane bei Mollusken („Imposex“ bzw. „Intersex“) wird die Fortpflanzung für die betroffenen Tiere unmöglich. Bei höheren Inzidenzen kann sich eine Population nicht mehr erhalten. Vor allem die Vermännlichung weiblicher Schnecken (z. B. durch Tributylzinn) stellt ein großes Problem dar (STROBEN ET AL. 1992, OEHLMANN ET AL. 1996, BAUER ET AL. 1997). Im Extremfall kann die Anlage männlicher Geschlechtsorgane nicht nur den Geschlechtsapparat blockieren, sondern auch den Eingeweidesack zum Reißen bringen.

Ein weiteres Beispiel sind missgebildete Amphibien, vor allem Frösche. Zu Beginn der 1990er Jahre wurden besonders auf dem amerikanischen Kontinent Frösche mit zusätzlichen Beinen oder verkümmertem Stimmapparat gefunden (OUELLET ET AL. 1997, GARDINER & HOPPE 1999). Ursache dieser Effekte ist die hormonmimetische Wirkung von Pestiziden und weiteren Xenobiotika. Für die Missbildung des Stimmapparates ist vor allem in die Gewässer gelangtes Atrazin verantwortlich (HAYES ET AL. 2002). Auch hier sind die betroffenen Tiere zwar lebensfähig, doch verhindert der fehlende Stimmapparat die Partnersuche und somit die Fortpflanzung. In gleicher Weise sind auch zusätzliche Beine nicht direkt tödlich, verhindern jedoch das zur Befruchtung nötige Anklammern am Partner. Weitere pestizidbedingte Effekte bei Amphibien sind die Hemmung der Larvalentwicklung (es entstehen „ewige Kaulquappen“) beziehungsweise eine verfrühte Reife (OPITZ ET AL. 2005).

Diese Beispiele zeigen, dass selbst geringe Schadstoffkonzentrationen, die nicht durch sichtbare Massensterben Handlungsbedarf auslösen, zu ernsthaften Gefahren für Populationen werden können. Trotz oft eindeutig verbesserter Situation in den Gewässern zeigt es sich, dass jeder Fremdstoff auf potenzielle Schadeffekte hin überprüft werden muss, gegebenenfalls sind Maßnahmen zur Eintragsminderung nötig.

Dies gilt auch für in der Umwelt detektierbare Medikamente, auch wenn direkt erkennbare Schadeffekte im Freiland - abgesehen von zwei Ausnahmen - bisher nicht beobachtet worden sind. Die erste Ausnahme stellen die bereits besprochenen Effekte durch Ethinylöstradiol und weitere Hormone dar. Auch für andere endokrine Disruptoren wurde Effekte bei umweltrelevanten Konzentrationen festgestellt. TRIEBSKORN ET AL. (1994A, B) berichten über verminderte Gewichtszunahme und Verhaltensänderungen bei Larven von Regenbogenforellen; elektronenmikroskopisch konnten außerdem zelluläre Schäden am Stratum opticum und am Sehnerv nachgewiesen werden.

Eine weitere Ausnahme bilden die unter den Geierpopulationen in Südasien beobachteten, durch Diclofenac ausgelösten Massensterben (OAKS ET AL. 2004). Die Tiere nahmen hier durch den Verzehr des Fleisches mit Diclofenac belasteter Rinder große Mengen dieses Antirheumatikums auf und erkrankten in der Folge an Eingeweidegicht, die zur Ablagerung von Harnsäuresteinen in allen Organen führte. Hierbei handelt es sich jedoch um eine regionale Besonderheit, die auf eine nichttypische Expositionssituation zurückzuführen ist. Die Substanzaufnahme erfolgte ausschließlich durch die extrem hoch belasteten Kadaver, nicht durch Oberflächen- oder Grundwasser, die typischen Träger von Medikamenten in der Umwelt.

Gleichwohl ist es erforderlich, Daten über mögliche Umwelteffekte von Medikamenten zu gewinnen. Laut BROOKS (PERSÖNLICHE MITTEILUNG 2004) akkumuliert beispielsweise Fluoxetin in Hirn, Leber und Gewebe von Fischen. Für andere Substanzen kann dies nicht ausgeschlossen werden. Sowohl durch direkte Aufnahme aus dem Wasser, als auch durch den Verzehr belasteter Nährtiere kann speziell in Fischen und anderen Konsumenten zweiter Ordnung eine kritische Belastung entstehen. Zudem ist bekannt, dass die Verklappung von pharmazeutischen Abfallprodukten im Meer dauerhaft nachteilige Effekte nach sich zieht (LEE & ARNOLD 1983, LEE & BIRD 1985). Unstrittig ist die Tatsache, dass Pharmaka Fremdstoffe in der Umwelt darstellen. Die möglichen Auswirkungen dieser Belastung sind weitgehend unbekannt.

Für die vorliegende Arbeit wurden das Antiepileptikum Carbamazepin, der Lipidsenker Clofibrinsäure, das Antibiotikum Ciprofloxacin und das Antidepressivum Fluoxetin als Testsubstanzen ausgewählt. Die Auswahl der Versuchssubstanzen erfolgte nach der Häufigkeit der

Nachweise in Oberflächengewässern, das weniger häufig bestimmte Fluoxetin wurde untersucht, um nach Carbamazepin eine zweite antidepressiv wirksame Substanz zu testen.

## 1.2 Risikobewertung von Xenobiotika und Relevanz der Versuchsorganismen

Im Folgenden werden die Untersuchungsmethoden für im Oberflächenwasser ermittelte Xenobiotika, speziell Pharmaka, beschrieben. Zu unterscheiden sind akute und chronische Umweltschäden, die durch ein Xenobiotikum ausgelöst werden.

Als schwerster akuter Umweltschaden ist die letal toxische Wirkung einer Substanz zu sehen. In den Zulassungsverfahren für Pestizide und andere umweltrelevante Substanzen wird die Toxizität bereits im Zulassungsverfahren bestimmt (BARRETT ET AL. 1994). Auch für Medikamente ist diese Prüfung vorgesehen. Speziell für Pharmaka und auch für Pestizide wird die Toxizität üblicherweise an Mäusen als Modellorganismen für Säugetiere bestimmt, anschließend werden die gewonnenen Daten auf Kilogramm Körpergewicht hochgerechnet. Als Kenngröße wird die LD<sub>50</sub> bestimmt, die Dosis, die bei 50% der Versuchstiere letal wirkt. Zur Bewertung der Umweltgefährlichkeit ist die LD<sub>50</sub> nur bedingt hilfreich, da in der Regel nicht bekannt ist, welche Dosis ein einzelner Organismus beim Eintritt eines Xenobiotikums in die Umwelt aufnimmt. Stattdessen wird hier die LC<sub>50</sub> herangezogen, die (Umwelt-) Konzentration, bei der 50% aller Versuchsorganismen sterben. Für die Bestimmung der aquatischen Toxizität dienen meistens Fische, etwa Zebrafärblinge (*Danio rerio*) sowie Daphnien und Algen (ECB 2003).

Neben letaler Wirkung sind auch andere akut toxische Effekte möglich. So wird zum Beispiel die Immobilisierung von Daphnien (z. B. *Daphnia magna*) untersucht. Einschränkungen der Bewegungsfähigkeit sind, da sie Flucht vor Räubern und Nahrungsaufnahme behindern, ebenso wie direkte Toxizität eine erhebliche Bedrohung. Weiterhin werden Wuchshemmung bei Algen oder Wasserlinsen untersucht, außerdem toxische Wirkungen auf Bakterien. Untersucht werden Cytotoxizität und Geschwindigkeit der Trübung durch Bakterien sowie die Hemmung der Biolumineszenz, z. B. bei *Vibrio fischeri*. Sämtliche Tests sind nach DIN oder OECD standardisiert.

Eine Risikobewertung, das so genannte Risk Assessment, erfolgt in mehreren Schritten. Maßgeblich für seine Durchführung ist allgemein das vom European Chemicals Bureau (ECB) herausgegebene Technical Guidance Document (TGD). Speziell für Risk Assessments zu Pharmakarückständen in der Umwelt wurde von der European Medicines Agency eine Richtlinie herausgegeben (EMA 2005). Deren Vorschriften zufolge teilt sich ein Risk Assessment für aquatische Problemstoffe in zwei Phasen, Phase I und II. Letztere ist wiederum in Tier A und Tier B unterteilt. In Phase I erfolgt zuerst eine Expositionsabschätzung. Es wird eine überschlägige Umweltkonzentration bestimmt (Predicted Environmental Concentration, PEC). Speziell für Pharmaka wird hierbei nur die jährliche Produktionsmenge sowie ein errechneter Faktor, der die Verbreitung angibt, einbezogen, außerdem die Abwassermenge pro Einwohner und die zu erwartende Verdünnung. Ergibt diese Berechnung eine PEC unter 0,01 µg/l, und lassen keine anderen Gesichtspunkte eine Umweltgefährdung erwarten, wird keine weitere Untersuchung vorgenommen.

Sollte sich eine PEC > 0,01 µg/l ergeben, beziehungsweise Hinweise auf eine Umweltrelevanz auch in niedrigeren Konzentrationen vorliegen, wird in Phase II eingetreten. In Tier A

werden zunächst die genauen chemischen Parameter der Substanz zusammengestellt, Studien zur Bioabbaubarkeit vorgenommen sowie eine erste Untersuchung der Ökotoxizität an aquatischen Organismen durchgeführt. Traditionell wird eine solche Bewertung an je einem Vertreter der ersten drei trophischen Stufen der aquatischen Flora und Fauna vorgenommen. Es handelt sich um die so genannte aquatische Trias. Als Repräsentanten der trophischen Stufen dienen üblicherweise je eine Art von Algen, Daphnien und Fischen (ECB 2003).

Vorrangiges Ziel der Sammlung chemischer Daten in Phase II, Tier A ist es, festzustellen, ob eine Substanz persistent und bioakkumulativ beziehungsweise persistent, bioakkumulativ und toxisch ist. Der angelegte Datensatz dient der Verfeinerung der PEC in Phase II, Tier B. In Phase II, Tier A, wird die PEC zunächst über eine Konkretisierung des Marktpenetrationsfaktors verfeinert. Dieser wird in Phase I standardmäßig mit einem Prozent angenommen. Nunmehr erfolgt eine genauere Berechnung unter Einbeziehung von Verbrauchsdaten, Einwohnerzahl und weiterer Parameter.

Anhand der gewonnenen Toxizitätsdaten wird berechnet, bei welcher Umweltkonzentration einer Substanz keine nachteiligen Effekte zu erwarten sind (Predicted No Effect Concentration, PNEC). Diese Konzentration wird berechnet, indem die in den Akuttests festgestellte niedrigste Effektkonzentration durch einen im TGD (ECB 2003) festgelegten Sicherheitsfaktor dividiert wird. Dieser Faktor soll sicherstellen, dass durch die nur unter Laborbedingungen ermittelten Daten nicht die tatsächliche Toxizität unterschätzt wird.

Beide Kenndaten, PEC und PNEC, werden nun durcheinander dividiert. Ergibt sich ein PEC/PNEC-Quotient  $<1$ , wird von keiner Umweltgefährdung ausgegangen. Bei einem Verhältnis  $>1$  wird in Phase II, Tier B eingetreten.

Hier erfolgt zunächst eine weitere Verfeinerung der PEC anhand von Verbrauchsdaten (im Falle von Pharmaka sind dies die Verschreibungsmengen). Wo möglich, sollen zur Risikobewertung in dieser Phase tatsächlich gemessene Umweltkonzentrationen benutzt werden. Weiterhin werden nun die Kapazitäten der Kläranlagen einkalkuliert, die das Abwasser der Region behandeln, für die eine PEC berechnet werden soll. Zudem wird, soweit bekannt, sowohl die durch Bioabbau als auch durch Adsorption an Klärschlamm bedingte Elimination der Substanz in der Kläranlage mit einbezogen.

Zudem werden nunmehr auch chronische Toxizitätstests durchgeführt, möglichst auf mehreren trophischen Stufen. Diese genaueren Effektdaten erlauben die Beaufschlagung niedrigerer Sicherheitsfaktoren, so dass nun eine PNEC mit größerer Sicherheit bestimmt werden kann. Verbleibt auch weiterhin ein PEC/PNEC-Quotient  $>1$ , ist Handlungsbedarf gegeben, etwa indem die Verwendung einer Substanz beschränkt oder der Gebrauch gänzlich verboten wird.

Da die Berechnungen in Phase II, Tier A noch sehr überschlägig sind und außerdem für die untersuchten Substanzen nur Tier-A-Daten vorliegen, wurde in dieser Arbeit direkt mit Tier-B-Versuchen begonnen. Somit konnten auch die vorliegenden Aussagen zur Umweltrelevanz dieser Pharmaka auf Plausibilität überprüft werden. In der Literatur liegen für alle vier Pharmaka ausschließlich Akutdaten vor. In dieser Arbeit werden vornehmlich chronische Tests durchgeführt. Die Testkonzentrationen wurden so gewählt, dass von umweltrelevanten Sediment- und Wasserkonzentrationen ausgegangen werden konnte. Die Tests sind außerdem so konzipiert, dass nicht nur toxische Effekte erfasst wurden. Vielmehr bietet die Darstellung eines kompletten Lebenszyklus bei *Chironomus riparius* und die Beobachtung der Reproduktion von *Lumbriculus variegatus* und *Potamopyrgus antipodarum* über Zeiträume

bis zu acht Wochen die Möglichkeit, auch subletale Schädigungen zu erfassen. Eine eingeschränkte Reproduktion gefährdet den Fortbestand der Population nicht akut, auf Dauer aber umso mehr. Zudem genügt es nicht, bei *C. riparius* allein das Überleben der Larven direkt nach der Exposition aufzunehmen. Während des Entwicklungszyklus bis zum Imago durchlaufen die Larven zahlreiche physiologische Perioden, die jede für sich einem Xenobiotikum neue Möglichkeiten zum Angriff bieten können. In jeder dieser Phasen sind unterschiedliche Gene aktiv. Somit liegen in jeder dieser Phasen neue Genprodukte (Enzyme) vor und werden unterschiedliche Enzymkaskaden aktiviert (ARMITAGE ET AL. 1995). Jede dieser Enzymkaskaden bietet neue Angriffsmöglichkeiten für einen Umweltschadstoff.

Zusätzlich schafft die Exposition in Sedimentversuchen nach OECD-Richtlinie 218 (OECD 2004) eine weitaus komplexere Versuchssituation, als mit der Akutexposition über Wasser gegeben ist. Bei der reinen Wassereexposition wird zunächst nur ein Eintrag über Integument und ggf. Kiemen untersucht. Die Exposition über Sediment bildet zusätzlich Effekte ab, die beispielsweise durch die Aufnahme belasteter Nahrung entstehen. In den hier durchgeführten Versuchen zur Exposition über Sediment wurde keine Nahrung während des Versuches zugesetzt. Den Versuchstieren stand zur Nahrungsversorgung nur zu Versuchsbeginn zugegebenes, gemahlenes Laub zur Verfügung. Während einer Equilibrationsphase zu Versuchsbeginn (mindestens drei, wenn möglich vierzehn Tage) kam dieses Laub in Kontakt mit der Versuchssubstanz. So konnte sich eine der Umweltsituation entsprechende Ausgangslage einstellen. Falls sich die Testsubstanz an das Laub anlagerte, erfolgte mit der Nahrungsaufnahme ein zusätzlicher Substanzeintrag in den Versuchsorganismus.

Als Versuchsorganismen wurden die Zuckmücke *Chironomus riparius*, die Zwergdeckelschnecke *Potamopyrgus antipodarum* und der Oligochaet *Lumbriculus variegatus* verwendet. Es handelt sich hierbei um vielfach erprobte und im Falle von *C. riparius* und *L. variegatus* um OECD-standardisierte Organismen (PHIPPS ET AL. 1993, SCHULTE-OEHLMANN 1997, WEST & ANKLEY 1998, OECD 2004, EGELER ET AL. 2005). Entsprechende Versuche sind nach TGD und EMEA-Richtlinie in der so genannten Tier-B-Phase im Risk Assessment vorgesehen. Sie dienen der abschließenden Entscheidungsfindung, wenn sich sowohl in Phase I als auch in Phase II, Tier A ein Verdacht auf Umweltgefährdung ergeben hat. *L. variegatus* und *C. riparius* dienen als Futter für Konsumenten höherer Ordnung, speziell Fische. Die Resultate der vorliegenden Arbeit geben somit nicht nur über die akuten oder chronischen Effekte der untersuchten Substanzen Aufschluss, sondern erlauben eine Extrapolation auf mögliche Folgen für das gesamte Ökosystem. Ein Wegbrechen dieser Glieder in der Nahrungskette würde unter Umständen auch zu erheblichen Verschiebungen in der Fischfauna führen, da sowohl Fried- als auch Raubfische *C. riparius* und *L. variegatus* als Nahrung nutzen (URANIA 2000).

Sämtlich aquatisch, ermöglichen die Versuchsorganismen die Betrachtung verschiedener Expositionspfade: *P. antipodarum* bewohnt vornehmlich Hartsubstrat, die Exposition gegenüber Xenobiotika erfolgt daher vornehmlich über die Wasserphase. Die Larven von *C. riparius* bewohnen Sedimentröhren, sie sind Detritusfresser. Xenobiotika werden aus dem Sediment, über den Sedimentaufwuchs und das Porenwasser aufgenommen. *L. variegatus* lebt ausschließlich sedimentbewohnend, die Tiere nehmen das Sediment zur Nahrungsversorgung komplett auf. Die Exposition erfolgt hier über Sediment und Porenwasser.

Gerade der letztere Expositionsweg ist von Bedeutung, da bei vielen der detektierten Pharmaka aufgrund ihrer chemischen Parameter vermutet werden kann, dass sie zur Akkumulation im Sediment neigen. Carbamazepin beispielsweise ist mit einem log  $P_{OW}$  von 2,45 nur wenig wasserlöslich, was eine Anreicherung in der Sedimentphase möglich erscheinen lässt.

Sedimente wirken bekanntermaßen als „Falle“ für verschiedenste Schadstoffe (FIEDLER & RÖSLER 1993), so dass es nicht ausreicht, nur die Exposition über die Wasserphase zu erfassen.

Mit den verwendeten Versuchsorganismen lassen sich nicht nur akut toxische Effekte abbilden, sondern vor allem Gefahren für den Fortbestand der jeweiligen Populationen auf lange Sicht untersuchen. *C. riparius* hat eine Generationszeit von circa vier Wochen, es kann also leicht ein kompletter Lebenszyklus abgebildet werden. Bei der parthenogenetischen *P. antipodarum* ist es ohne großen Aufwand möglich, die Anzahl der pro Tier gebildeten Embryonen zu bestimmen. Dies macht diese Art zu einem für die Bestimmung östrogenen oder androgenen Effekte besonders geeigneten Organismus (SCHULTE-OEHLMANN 1997), aber auch jeder andere die Reproduktion beeinträchtigende Faktor wird sofort wahrgenommen. *L. variegatus* schließlich vermehrt sich unter Laborbedingungen ungeschlechtlich durch Querteilung. Eine Beschleunigung oder Verlangsamung der Teilungsrate ist sehr leicht erkennbar und erlaubt binnen weniger Wochen Rückschlüsse auf mögliche, den Fortbestand der Population gefährdende Effekte von Xenobiotika.

### 1.3 Kenntnisstand und Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Daten über die möglichen chronischen Effekte ausgewählter Pharmaka zu erheben.

Wie oben ausgeführt, sind zur Beurteilung der Umweltgefährlichkeit einer Substanz sowohl chemische Kenndaten als auch Daten über Vorkommen und Verbleib (fate) der Substanz in der Umwelt erforderlich. Außerdem werden Effektdaten mit möglichst vielen Modellorganismen benötigt.

Chemische Kenndaten sind für praktisch alle Pharmaka vorhanden, jedoch in der Regel nicht publiziert. Sie werden während der Entwicklung einer Substanz erhoben und sind beim Hersteller und der Zulassungsbehörde dokumentiert. Außerdem werden in der Entwicklung auch diverse Toxizitätsdaten erhoben, dies sind jedoch meist Daten zur Säugertoxizität oder Daten über die Wirkung der Substanz auf das Zielorgansystem und über mögliche Nebenwirkungen. Zur Abschätzung von Umweltgefährdungen sind diese Daten in der Regel nicht hilfreich.

Die Umwelttoxizität von Pharmaka ist bislang fast ausschließlich in Akuttests von geringer Komplexität untersucht worden (z. B. HANISCH ET AL. 2002). Nur gelegentlich liegen Daten aus längerfristigen, komplexeren Tests vor (BROOKS ET AL. 2003B). Allen diesen Tests ist gemein, dass meist nur toxische Wirkungen untersucht werden. Verschiebungen des Geschlechterverhältnisses beispielsweise, wie sie bei *Chironomus* möglich sind, oder Effekte auf die Fekundität werden nur begrenzt untersucht. Fluoxetin ist in dieser Hinsicht gut untersucht (FONG 1998, 2001), andere Medikamente überhaupt nicht. Das Beispiel der missgebildeten Frösche zeigt jedoch, dass es nicht ausreicht, nur auf Toxizitäten zu achten.

Messdaten über Umweltkonzentrationen von Pharmaka sind bislang - von wenigen Ausnahmen abgesehen - nur in Grund- und Oberflächenwasser erhoben worden. Hier liegt eine Fülle von Daten vor (TERNES 1998, SATTELBERGER 1999, GOLET ET AL. 2001, CALAMARI ET AL. 2003, TIXIER ET AL. 2003, WIEGEL ET AL. 2004). Messungen von Pharmaka im Sediment sind

dagegen bislang nur sehr vereinzelt erfolgt (SCHARF ET AL. 2004, FURLONG 2006, PERSÖNLICHE MITTEILUNG).

Solche Daten werden dringend benötigt, um Verteilungsmuster von Pharmaka bestimmen zu können. LÖFFLER ET AL. (2005) zeigten, dass sich manche Pharmaka zwischen den beiden Kompartimenten Sediment und Wasser verteilen. Somit gehen mögliche Umwelteffekte von Pharmaka nicht ausschließlich von Belastungen im Wasser aus. Um die Bioverfügbarkeit von Pharmaka in der Umwelt zu ermitteln, werden auch Sedimentmesswerte benötigt. In der vorliegenden Arbeit werden daher auch Sedimentproben aus den Versuchen auf ihren Gehalt an der jeweiligen Testsubstanz analysiert, um Aufschluss über die Verteilung der Testsubstanz und die möglichen Aufnahmepfade zu erhalten.

Daten über Elimination in Kläranlagen liegen in größerem Umfang vor. Meistens zeigt sich, dass nur geringe Eliminationen stattfinden. Oft wird durch Entfernung der Glucuronate von den Molekülen der eigentliche Wirkstoff wieder freigesetzt (MÖHLE ET AL. 1999, WEGENER ET AL. 1999, TERNES 2000B).

Für Fluorochinolone ist bekannt, dass sie sich zu merklichen Anteilen an Klärschlämme anlagern (KÜMMERER 2003, GOLET 2003). Bei zahlreichen Pharmaka findet jedoch weder Elimination durch Adsorption am Klärschlamm noch Abbau statt. Offensichtlich ist die Bakterienflora in Kläranlagen nicht geeignet, die eingetragenen Substanzen zu metabolisieren. Auch mechanische Filtermechanismen sind nicht ausreichend.

Die Datenlage zu Pharmaka in der Umwelt präsentiert sich daher insgesamt als lückenhaft, so dass ein sicheres Risk Assessment bislang kaum möglich ist.

Mit dieser Arbeit soll die Datenlage für die vier untersuchten Substanzen verbessert und anhand der gewonnenen Daten eine Bewertung des möglichen Umweltrisikos der untersuchten Pharmaka vorgenommen werden. Wenn möglich, sollen bestehende Einschätzungen korrigiert werden. Für die untersuchten Pharmaka Carbamazepin, Clofibrinsäure und Ciprofloxacin liegen bislang zwar Daten aus Akuttests vor (HANISCH ET AL. 2002), jedoch keine chronischen Effektdaten. Effekte von Carbamazepin sind vor der Publikation der hier erhobenen Daten bislang nicht beschrieben worden (OETKEN ET AL. 2005), für Ciprofloxacin gibt es zusätzlich zu den in HANISCH ET AL. 2002 vorhandenen Akuttestdaten Berichte über Veränderungen an Bakteriengenomen (HARTMANN ET AL. 1999), jedoch keine Informationen über chronische Effekte auf Invertebraten. Clofibrinsäure ist ebenfalls auf ihre akute Wirkung hin untersucht, jedoch waren auch hier trotz intensiver Recherche keine Berichte über chronische Effekte auffindbar. Fluoxetin ist unter anderem durch Arbeiten von BROOKS ET AL. (2003A, B) und FONG (1998) besser charakterisiert als die anderen Pharmaka. Diese Arbeiten liefern jedoch keine Angaben über Effekte auf die hier verwendeten Versuchstiere. Fluoxetin wurde daher ebenfalls untersucht. Unter anderem sollte festgestellt werden, ob *C. riparius* ähnlich wie die von BROOKS ET AL (2003A) genutzten *C. tentans* reagieren und ob die parthenogenetischen *P. antipodarum* ähnliche Effekte zeigen, wie sie von FONG (1998) für Zebra-muscheln beschrieben wurden.

Nachdem mittlerweile mehrere Veröffentlichungen über die Wirkungen von Hormonen in der Umwelt vorliegen, sollten in dieser Arbeit nicht direkt hormonell wirksame Arzneimittel untersucht werden. Bislang liegen keine Erkenntnisse über Effekte bei umweltrelevanten Konzentrationen vor und bisherige Bewertungen (z. B. HANISCH ET AL. 2002) stützen sich ausschließlich auf Daten, die in Akuttests gewonnen wurden. Das Hauptaugenmerk galt daher den möglichen chronischen Effekten von Pharmaka, da diese analog zu den für Hormone beschriebenen, bereits bei sehr geringen Umweltkonzentrationen vorstellbar sind. Zudem sind



derartige Effekte in vielfältiger Weise denkbar. FONG (2001) gibt einen Überblick über die unspezifischen Effekte von Fluoxetin auf verschiedene Taxa. Die Arbeit zeigt, dass bei Invertebraten häufig Mechanismen betroffen sind, die von der ursprünglichen Konzeption des Wirkstoffes her nicht angenommen werden konnten. Dies steht im Einklang mit der Arbeit von OAKS ET AL. (2004), in der die aufgrund der an Säugetieren gewonnenen Daten völlig unerwartete Wirkung von Diclofenac auf Geier beschrieben wird. Die direkt tödliche Wirkung stellt eine Ausnahme dar. So, wie endokrine Disruptoren nicht direkt toxisch wirken, zeigt auch die Arbeit von FONG (1998), dass keine direkt toxische Wirkung auftritt. Eben das dort beschriebene vorzeitige Abbläichen kann jedoch den Fortbestand der Population in folgenden Generationen gefährden.

Derartige Effekte können auch für die weiteren Pharmaka nicht ausgeschlossen werden. Für Carbamazepin, Clofibrinsäure und Ciprofloxacin wurden Effekte auf das menschliche Hormonsystem nachgewiesen (MAGGIOLO ET AL. 1991, ISOJARVI ET AL. 1995, XU ET AL. 2001). Außerdem sind unspezifische Effekte analog zu denen von Fluoxetin und Diclofenac denkbar. Vor diesem Hintergrund sind chronische Effektdaten erforderlich, um das mögliche Umweltisiko von Pharmaka richtig einzuschätzen.

Durch den Einstieg direkt auf Ebene der Phase II, Tier B soll auch die Verlässlichkeit der bestehenden Herangehensweise für Problemstoffe wie Pharmaka getestet werden, die in ihrer Kombination aus sehr geringer Umweltkonzentration und gleichzeitiger hoher Wirksamkeit eine neue Dimension von Umweltschadstoffen darstellen. Laut EMEA (2005) stellt diese Herangehensweise die genaueste Methode dar, um auftretende Effekte zu beurteilen. Die hierbei einzukalkulierenden Sicherheitsfaktoren betragen maximal 100, in den vorigen Stufen werden zehnfach höhere Faktoren einkalkuliert. Bei ausreichender Datenlage ist lediglich ein Faktor von 10 einzukalkulieren, somit können hier erzielte Resultate relativ direkt auf die Freilandsituation übertragen werden. Die hier erhobenen Daten versprechen eine deutlich sichere Beurteilung der Umwelteffekte von Pharmaka, als anhand der vorhandenen Datenlage möglich.

Zusätzlich zu den Effekten auf Invertebraten sollten auch Effekte auf Protisten untersucht werden. Einzeller leben in immenser Anzahl im Wasser und stehen mit gewässerbelastenden Substanzen in direktem Kontakt. Als Destruenten sind sie zudem wichtiger Bestandteil des Ökosystems. Verschiedentlich wurden bereits Toxizitätstests mit Einzellern durchgeführt. Von besonderer Bedeutung sind hier Arten der Gattung *Tetrahymena* (SCHULTZ 1997).

In dieser Arbeit wurde versucht, Effekte auf einen Destruentenmikrokosmos abzubilden. Die Idee solcher Mikrokosmen ist mehrfach in der Literatur zu finden (z. B. LAWLER & MORIN 1993), jedoch wurden sie in den meisten Fällen nur zur Abbildung von Populationsdynamiken benutzt. Hier wurde ein Mikrokosmos aus *Tetrahymena thermophila* und *Blepharisma japonicum* verwendet. Beide Arten sind in Mikrokosmosversuchen erprobt (MORIN 1999, LAW ET AL. 2000, DIEHL & FEISSEL 2001). Da zudem Bakterien in den Ansätzen vorhanden waren, stellt der Mikrokosmos ein komplettes Nahrungsnetz dar. Besonders in der Diskussion um die Umwelteffekte von Antibiotika verspricht dieser Ansatz Erkenntnisse, da Bakterien erstes Glied in der Nahrungskette und wesentlicher Nahrungsbestandteil beider Einzellerarten sind. Hier eintretende Effekte hätten drastische Auswirkungen auf die von Bakterien abhängigen Einzeller. Zudem wäre der Abbau toter Biomasse und somit die Nährstoffrückgewinnung für das Ökosystem gefährdet.

In der terrestrischen Ökotoxikologie ist die Untersuchung von Effekten, die die Nährstoffrückgewinnung gefährden, seit langem gängige Praxis (SWIFT ET AL. 1979, FÖRSTER ET AL.

2004). In der aquatischen Ökotoxikologie sind derartige Untersuchungen bislang nicht gebräuchlich. Mit der Untersuchung akuter Effekte auf Bakterien liegen zwar Ansätze vor, die jedoch keinen Einblick in die Funktionalität des kompletten Systems der Destruenten erlauben. Das hier erprobte System hingegen integriert über Destruenten erster, zweiter und dritter Ordnung und erlaubt so Aussagen von größerer Tragweite.

Weiterhin sollen Möglichkeiten zur Verminderung der Pharmakafracht in Gewässern aufgezeigt werden. Vorrangig sollen Methoden diskutiert werden, die keine Regulierung von Pharmaka wie Nutzungsbeschränkungen oder Verbote beinhalten, da solche Schritte nur begrenzt möglich sind. Für weit verbreitete Substanzen wie Diclofenac ist eine Nutzungsbeschränkung nicht denkbar, auch kommen Substanzverbote bei dringend benötigten Pharmaka wie Carbamazepin nicht in Frage. In dieser Arbeit werden daher neben einer reinen Betrachtung der Risiken der Testsubstanzen auch Möglichkeiten diskutiert, die die Pharmakafracht in Gewässern reduzieren können, aber nicht zu Substanzverboten führen.

Möglichkeiten zur Verminderung des Eintrags von Pharmaka sind eine Reduzierung des Medikamentenverbrauchs oder Änderungen in der Verschreibungspraxis. Vorrangig sollen jedoch Methoden zur Reinigung belasteter Abwässer und zur Verminderung des Eintrags von Rückständen in das Abwassersystem diskutiert werden. Derartige Techniken sind vor dem Hintergrund, dass auf einen großen Teil der aktiven Wirkstoffe der derzeitigen Pharmaka nicht verzichtet werden kann, die Methode der Wahl, um der Belastung der Gewässer durch Pharmaka zu begegnen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Versuchssubstanzen

Die Auswahl der Versuchssubstanzen erfolgte aufgrund verschiedener Kriterien. Zum einen wurde darauf geachtet, mit den ausgewählten Wirkstoffen möglichst viele verschiedene Substanzklassen zu erfassen. Zum anderen wurden anhand von Literaturdaten Substanzen ausgewählt, die weit verbreitet in der aquatischen Umwelt auftreten. Schließlich wurde auch in Betracht gezogen, inwieweit über einen Wirkstoff oder eine Substanzklasse bereits Effektdaten beziehungsweise Hinweise auf Umwelteffekte vorlagen. Die folgenden Substanzen wurden ausgewählt:

- a) Antiepileptika: Carbamazepin
- b) Blutfettsenker: Clofibrinsäure
- c) Antibiotika: Ciprofloxacin
- d) Antidepressiva: Fluoxetin

Tabelle 2.1 fasst die physikalischen Kenndaten der einzelnen Substanzen zusammen:

**Tabelle 2.1.** Physikalische Eigenschaften der Versuchssubstanzen

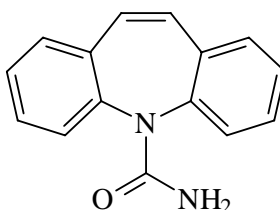
	Carbamazepin	Clofibrinsäure	Ciprofloxacin	Fluoxetin
Wirkstoffklasse	Harnstoffderivate	Phenoxyalkancarbonsäurederivate	Chinolonecarbon-säurederivate	Propylaminderivate
Chemische Bezeichnung nach IUPAC	5H-Dibenz[b,f]-azepin-5-carboxamid	2-(4-Chlorophenoxy)-2-methylpropionsäure	1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-chinolincarboxylsäure	(dl)-N-Methyl-3-phenyl-3-((alpha, alpha, alpha-trifluor-p-tolyl)oxy)-propylamin
Handelsname (z. B.)	Tegretol	Regelan N 500	Ciprobay	Prozac
Hersteller (u. a.)	Novartis, Ratiopharm	Merz & Co., Stada, Verla	Bayer AG	Eli Lilly & Co.
CAS-Nummer	298-46-4	85721-33-1	85721-33-1	54910-89-3
Summenformel	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> ClO <sub>3</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> F <sub>3</sub> NO
Molekulargewicht [g/Mol]	236,28	214,65	331,35	309,33
Wasserlöslichkeit [mg/l]	17,7	583	1,15E+004	50
Dampfdruck [mm Hg]	1,84E-007	0,000113	2,85E-013	2,52E-005
Schmelzpunkt [°C]	190,2	118–119	258–260	157,5–158,7
PKa	14,0	3,2	6,18 ± 0,05	10,06 ± 0,1
Henry-Konstante (atm·m <sup>3</sup> /mol)	1,08E-010	2,19E-008	5,09E-019	8,9E-008
log P <sub>OW</sub>	2,45	2,57	0,28	4,05

Angaben nach MERSMANN (2003) und SYRACUSE PHYSPROP DATABASE (2005)

#### a) Carbamazepin

Carbamazepin gehört zur Indikationsgruppe der Antiepileptika. Es wurde zuerst 1957 synthetisiert (SCHINDLER & BLATTNER 1961). Gemeinsam mit Valproinsäure und Phenytoin ist es mittlerweile das Mittel der Wahl bei Langzeittherapien. Neben seiner antiepileptischen Wirkung wird es bei zahlreichen weiteren Indikationen verwendet, etwa zur Behandlung manischer Depressionen, bei akutem Alkoholentzug, Trigeminus- und Glossopharyngeusneuralgie, postherpetischer Neuralgie und zur Behandlung von Symptomen an amputierten Gliedmaßen („Phantom-Limb-Symptoms“).

Es wirkt in Cortex und Hippocampus (SCHMUTZ 1985). Als wesentliche Effekte der Substanz sind eine Erhöhung des Gehalts von Gamma-Aminobuttersäure (GABA) bzw. eine Verminderung des Abbaus dieser Substanz zu nennen. Außerdem sinkt nach Carbamazepin-Gabe der Alaningehalt im Cortex. Der Acetylcholingehalt im Striatum steigt, der Cholingehalt hingegen nimmt ab. Wichtig für die antidepressive Wirkung ist eine Steigerung des Serotoningehalts im Gehirn (SCHMUTZ 1985). Nach CONSOLO ET AL. (1976) sind diese Effekte nicht auf Metaboliten von Carbamazepin, sondern vielmehr auf die Reinsubstanz zurückzuführen. AMBROSIO ET AL. (2002) ermittelten, dass Carbamazepin in rezeptorvermittelter Weise wirkt und die Wirkung bestimmter Neurotransmitter blockiert. Vor allem wirkt es als Antagonist an Adenosinrezeptoren, auch konnte eine Affinität zu Transportern biogener Amine nachgewiesen werden. Desgleichen wird die cAMP-Produktion behindert. Die Wirkung von Carbamazepin geht somit auf ein Zusammenspiel rezeptorvermittelter Effekte zurück. Abbildung 2.1 zeigt die Molekularstruktur.



**Abb. 2.1.** Strukturformel von Carbamazepin

In Deutschland wurden im Jahr 2003 76 t des Wirkstoffes verordnet (SCHWABE & PAFFRATH 2004). Dies sind ca. 40,8% der verordneten Tagesdosierung aller Antiepileptika.

Das Mittel ist der Wirkstoffklasse der Harnstoffderivate zuzuordnen. Es handelt sich um ein weißes bis schwach gelblichweißes, kristallines Pulver, das in mindestens drei wasserfreien polymorphen Modifikationen sowie einem Dihydrat vorkommen kann. Die wasserfreien Formen gehen bei Kontakt mit Wasser in das Dihydrat über. Bei erhöhten Temperaturen wird Carbamazepin in wässriger Lösung allmählich zum Iminostilben reduziert, in Anwesenheit von Säuren erfolgt Ringverengung zum 9-Methylacridin (HARTKE & MUTSCHLER 1993). Unter normalen Temperaturen sowie in reiner wässriger Lösung bleibt Carbamazepin jedoch relativ stabil. Eine Tagesdosis enthält je nach Art und Schwere der zu therapierenden Erkrankung 800–1200 mg (MUTSCHLER 1991). Die definierte Tagesdosis (Defined Daily Dose, DDD) laut WHO beträgt 1000 mg (WHO 2005). Die Bioverfügbarkeit der Substanz liegt zwischen 70–80% (HARTKE & MUTSCHLER 1993). Die verbleibenden 20–30% werden unverändert mit den Faeces ausgeschieden (ASP 1999). Weitere 2–3% werden unverändert im Urin detektiert (HARTKE & MUTSCHLER 1993). Hauptmetabolit ist das über Carbamazepin-10,11-epoxid gebildete trans-10,11-Dihydro-10,11-Dihydroxycarbamazepin (HARTKE & MUTSCHLER 1993). Es treten außerdem N-Glucuronide auf (SATTELBERGER 1999). Die Rolle dieser Glucuronide als Eintragspfad für Carbamazepin in die aquatische Umwelt ist bislang unklar (ZÜHLKE 2004). Da jedoch häufig Glucuronide während der Abbauprozesse in Kläranlagen gespalten werden (MÖHLE ET AL. 1999, WEGENER ET AL. 1999, TERNES 2000B), ist ein Eintrag von Carbamazepin in die Umwelt auch auf diesem Weg nicht auszuschließen.

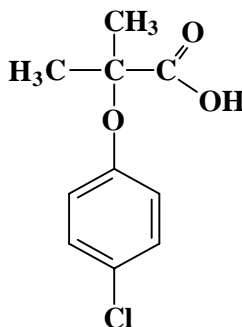
Carbamazepin wird in Kläranlagen nicht eliminiert (TERNES 1998) und gelangt über den Vorfluter in die Umwelt. Vor allem in Ballungsräumen ergeben sich so hohe Umweltkonzentrationen. So wurden in der Körsch bei Stuttgart 1,2 µg/l Carbamazepin nachgewiesen (SACHER 2002). TERNES (1998) ermittelte in der Nähe von Frankfurt im Main maximal 6,3

$\mu\text{g/l}$ , die Mediankonzentration aller Messungen bei dieser Untersuchung betrug  $0,82 \mu\text{g/l}$ . Auch im Trinkwasser wurden  $10\text{--}30 \text{ ng/l}$  Carbamazepin gemessen (TERNES 2000A). HANISCH ET AL. (2002) errechneten für Brandenburg eine PEC von  $0,82 \mu\text{g/l}$ . In der hier vorliegenden Arbeit wurde als Grundlage für die Testkonzentrationen der von SACHER ET AL. (1998) im Rhein gemessene Wert von  $2,1 \mu\text{g/l}$  Carbamazepin verwendet.

Carbamazepin wurde als Reinsubstanz von Sigma-Aldrich in Taufkirchen (Deutschland) bezogen.

#### b) Clofibrinsäure

Clofibrinsäure ist der Metabolit der Medikamente Clofibrat, Bezafibrat, Etofibrat, Etofyllinclofibrat, Fenofibrat und Gemfibrozil aus der Indikationsgruppe der Lipidsenker. Die Reinsubstanz liegt als kristallines, gelblichweißes Pulver vor. Zwar wird Clofibrat aufgrund verschiedener Nebenwirkungen kaum noch verwendet und in der BRD sind mittlerweile keine Clofibrat-Präparate mehr auf dem Markt (MUTSCHLER 1991, SCHWABE & PAFFRATH 2004), doch bildet sich Clofibrinsäure auch im Zuge des Abbaus der anderen genannten Medikamente. Die DDD beträgt bei Clofibrat  $2000 \text{ mg}$ , Etofibrat und Etofyllinclofibrat werden in Tagesdosen zwischen  $500$  und  $900 \text{ mg}$  verabreicht (MUTSCHLER 1991, WHO 2005). Die DDD für Bezafibrat beträgt  $600 \text{ mg}$ , für Fenofibrat  $200 \text{ mg}$  und Gemfibrozil  $1200 \text{ mg}$ . Laut SCHWABE & PAFFRATH (2004) ergibt sich für Deutschland folgende jährliche Verordnungsmenge:  $22,4 \text{ t}$  Bezafibrat,  $12,6 \text{ t}$  Fenofibrat und  $3,12 \text{ t}$  Gemfibrozil. Insgesamt ergeben sich somit  $38,12 \text{ t}$ , das entspricht ca.  $30\%$  der Gesamtmenge der verordneten Cholesterinresorptionshemmer. Bezogen auf alle Arten von Lipidsenkern sind es jedoch nur  $2,99\%$  der Gesamtmenge, da mittlerweile fast zehnmal mehr Statine als Cholesterinresorptionshemmer verordnet werden (SCHWABE & PAFFRATH 2004). Die Struktur des Wirkstoffes ist in Abbildung 2.2 dargestellt.



**Abb. 2.2.** Strukturformel von Clofibrinsäure

Die Wirkung von Clofibrinsäurepräparaten beruht auf einer Stärkung der Aktivität der Lipoproteinlipase. Hierdurch werden in der Peripherie verstärkt Very-Low-Density-Lipoproteine (VLDL) in Low-Density-Lipoproteine (LDL) umgesetzt. Die Senkung des Cholesterinspiegels im Blut beruht vermutlich auf einem weiteren Effekt der Clofibrinsäure, einer Hemmung der HMG-CoA-Reduktase und somit einer Hemmung der endogenen Cholesterinsynthese. Infolgedessen verarmen die Leberzellen an Cholesterin, wodurch verstärkt LDL-Rezeptoren aktiviert werden, die das im Blut zirkulierende exogene Cholesterin aufnehmen.

Nach einer Plasmahalbwertszeit von  $12 \text{ Stunden}$  wird Clofibrinsäure zu über  $90\%$  glucuroniert über die Niere ausgeschieden, weitere  $6\%$  werden unverändert ausgeschieden (MUTSCHLER 1991). Nach MÖHLE ET AL. (1999), WEGENER ET AL. (1999) und TERNES (2000B)

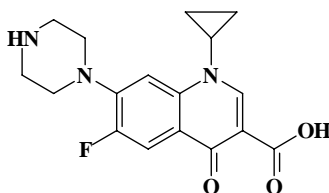
ist anzunehmen, daß in den Kläranlagen eine Spaltung des Glucuronids erfolgt, so dass die Substanz dort wieder als Reinsubstanz vorliegen würde. Es wurden Eliminationsraten von bis zu ca. 51% beobachtet (TERNES 2000A). Das Molekül liegt bei umweltrelevanten pH-Werten dissoziiert vor. Aufgrund des im Molekül vorhandenen tertiären C-Atoms und der drei weiteren C-Atome als nächste Nachbarn ist das Molekül weitgehend abbauresistent; laut HUPPERT (1999) stellen tertiäre C-Atome starke Abbauhindernisse dar.

Clofibrinsäure wurde in der aquatischen Umwelt 1992 eher zufällig nachgewiesen: Bei der Analyse von Berliner Grundwasserproben auf Pflanzenschutzmittlrückstände wiesen STAN & LINKERHÄGNER (1992) Clofibrinsäure aufgrund der Strukturanalogie zu dem Herbizid Mecoprop nach. Seitdem erfolgten weitere Nachweise, auch im Oberflächenwasser. TERNES (1998) fand bis zu 1,6 µg/l in Wasserproben aus Kläranlagenabläufen (90-Perzentil: 0,72 µg/l), in Proben aus Oberflächengewässern lag die Maximalkonzentration bei 0,55 µg/l (90-Perzentil: 0,21 µg/l). BUSER & MÜLLER (1998) fanden in der Nordsee bis zu 34,7 ng/l, in Schweizer Seen konnten bis zu 9 ng/l nachgewiesen werden. HEBERER & STAN (1998) fanden in Berliner Oberflächengewässern bis zu 875 ng/l. Trotz der bereits 1991 rückläufigen Verordnungsmengen (MUTSCHLER 1991) ist die Substanz somit bis heute weithin nachweisbar. TIXIER ET AL. (2003) konnten in Schweizer Kläranlagenabläufen noch bis zu 60 ng/l nachweisen, in Oberflächengewässern wurden noch bis zu 30 ng/l Clofibrinsäure ermittelt. METCALFE ET AL. (2003) fanden bis zu 175 ng/l (Median: 59 ng/l) im Detroit River, ANDREOZZI ET AL. (2003) maßen in Kläranlagenabläufen bis zu 680 ng/l und BOYD ET AL. (2003) ermittelten in einer Trinkwasseraufbereitungsanlagen 103 ng/l. CALAMARI ET AL (2003) konnten bei Chivasso im Po 5,77 ng/l nachweisen. Den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Versuchskonzentrationen liegt der von TERNES (1998) nachgewiesene Maximalwert von 0,55 µg/l für Oberflächengewässer zugrunde.

Die Versuchssubstanz wurde von Acros Organics, Geel, Belgien bezogen.

#### c) Ciprofloxacin

Ciprofloxacin zählt zur Wirkstoffgruppe der antibakteriell wirksamen Gyrasehemmer. Der Wirkungstyp dieser Substanzen ist bakterizid (MUTSCHLER 1991). Er beruht auf einer Hemmung der A-Untereinheit der DNA-Gyrase. Dieses Enzym ist eine Topoisomerase Typ II, es löst Phosphat-Zucker-Bindungen in beiden DNA-Einzelsträngen und ermöglicht so das Verdrillen (Supercoiling) der DNA in der Ruhephase. Dies wiederum ist entscheidend für die richtige Unterbringung des Chromosoms in der Zelle. Die Verdrillung erfolgt, indem die DNA zunächst geöffnet wird. Anschließend schiebt sich ein weiterer Teil des DNA-Stranges durch diese Öffnung, die anschließend wieder verschlossen wird. Die Wirkung der Gyrasehemmer besteht darin, dass sie mit dem Wiederverschließen der DNA-Stränge interferieren. Aufgrund unterschiedlicher Konfiguration bei höheren Organismen bleibt die Wirkung der Gyrasehemmer auf Bakterien beschränkt. Abbildung 2.3 stellt die Struktur des Wirkstoffs dar.



**Abb. 2.3.** Strukturformel von Ciprofloxacin

Man unterscheidet Gyrasehemmer 1. und 2. Generation. Letztere sind durch Substitution von Fluor an C-6 und einem Piperazin- bzw. Methylpiperazinring an C-7 gekennzeichnet, was die *Pseudomonas*-Wirksamkeit dieser Verbindungen bedingt. Das Wirkungsspektrum der Gyrasehemmer erstreckt sich auf gramnegative Keime inklusive *Pseudomonas*- und *Salmonella*-Spezies sowie auf grampositive Keime. Weiterhin sind die Substanzen gegen Mykoplasmen, Chlamydien und Legionellen wirksam. Aufgrund der erwähnten Substitutionen dringen die Gyrasehemmer der 2. Generation besser in Bakterien ein, hierdurch erklärt sich die höhere Wirksamkeit. In vitro besitzt Ciprofloxacin die höchste Wirksamkeit. Es zählt zu den so genannten Standardfluorochinolonen, systemisch anwendbaren Fluorochinolonen mit breiter Indikation.

Laut SCHWABE & PAFFRATH (2004) sind die Fluorochinolon-Antibiotika mittlerweile die viertstärkste Verordnungsgruppe im Bereich der Antibiotika und Chemotherapeutika. Zwischenzeitlich wurden steigende Resistenzraten beobachtet, die jedoch aktuell den Einsatz von Ciprofloxacin und verwandten Substanzen noch nicht in Frage stellen. Die DDD laut WHO (2005) beträgt für orale Gabe 1 g, für parenterale Gabe 0,5 g. Ciprofloxacin wird in jüngerer Zeit verstärkt verordnet, 2003 ergab sich ein Anstieg der Verordnungsmenge von 20% gegenüber 2002, es wurden 8,8 Millionen DDD verschrieben. Wegen der Unterscheidung zwischen oraler und parenteraler Gabe kann keine exakte Substanzmenge berechnet werden. Im Worst-case-Fall könnte eine Verbrauchsmenge von 8,8 Tonnen angenommen werden, aufgrund der geringeren Dosis bei parenteraler Gabe sollte die tatsächliche Menge jedoch niedriger liegen.

Ciprofloxacin ist ein weißes, kristallines Pulver. Die Substanz wird im Körper zu über 70% resorbiert und liegt zu ca. 40% an Plasmaproteine gebunden vor. Die Plasmahalbwertszeit beträgt vier Stunden. 32% einer Ciprofloxacin-Dosis werden über die Faeces ausgeschieden, 44% über den Urin (bis zu 50% hiervon wiederum als aktive Metaboliten). Weitere 11–12 % werden als inaktive Metaboliten ausgeschieden. Es gelangen also bis zu 62% einer Ciprofloxacin-Dosis unverändert in die Umwelt (FORTH ET AL. 1990). Da Teile des Antibiotikums im Zuge der Metabolisierung glucuroniert werden, besteht die Möglichkeit, dass auch ein Teil der Metabolite in der Umwelt wieder aktiviert wird (MÖHLE ET AL. 1999, WEGENER ET AL. 1999, TERNES 2000B).

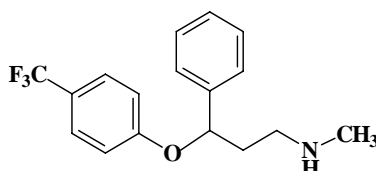
Ciprofloxacin wurde bislang vornehmlich in den Abwasserabläufen von Kliniken sowie in Kläranlagenabläufen nachgewiesen. HARTMANN ET AL. (1999) fanden in Klinikabwässern bis zu 124,5 ng/l. In Oberflächengewässern konnten 220 ng/l nachgewiesen werden (HANISCH ET AL. 2002). GOLET ET AL. (2001) fanden in den Primär- und Tertiärabläufen verschiedener Zürcher Kläranlagen bis zu 331 ng/l Ciprofloxacin. CALAMARI ET AL (2003) konnten bei Chivasso im Po 26,15 ng/l nachweisen.

Die Substanz wurde als Ciprofloxacin-Hydrochlorid von Fährhaus Pharma, Hamburg bezogen.

#### d) Fluoxetin

Der Wirkstoff Fluoxetin zählt zur Wirkstoffgruppe der Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (Serotonin Reuptake Inhibitors, SRI). Ursprünglich wurden diese Substanzen als „Selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer“ (Selective Serotonin Inhibitors, SSRI) bezeichnet, die neue Bezeichnung soll den Eindruck vermeiden, dass die Wirkung dieser Substanzklasse auf serotonerge Systeme beschränkt sei (NTP-CERHR-FLUOXETINE 2004). Fluoxetin wurde

1988 als erster SRI von Eli Lilly & Co. nach 10 Jahren klinischer Testphase unter den Produktnamen Prozac® und Sarafem™ in den USA auf den Markt gebracht. Diese Produkte finden in der Therapie unterschiedliche Anwendung (WONG ET AL. 1995). Prozac® wird hauptsächlich zur Behandlung von Depressionen und Persönlichkeitsstörungen eingesetzt, Sarafem™ dient zur Behandlung prämenstrueller Beschwerden. Abbildung 2.4 stellt die Struktur des Wirkstoffs dar.



**Abb. 2.4.** Strukturformel von Fluoxetin

Die Wirkung von Fluoxetin beruht auf einer Inhibition des 5-HT-(Serotonin-)Rezeptors (AKTORIES ET AL. 2005). Die Substanz zählt zu den nicht-sedierenden Antidepressiva. Sie wirkt prinzipiell antisuizidal, durch die Antriebssteigerung resultiert jedoch in den ersten zwei Wochen der Anwendung erhöhte Suizidgefahr. Durch Inhibition von Cytochrom-P2-Enzymen kann Fluoxetin den Plasmaspiegel anderer Antidepressiva erhöhen.

Aufgrund von Nebenwirkungen wie gastrointestinalen Störungen (z.B. Diarrhö, Gewichtsverlust, Übelkeit, Appetitlosigkeit), exzitatorischen Symptomen sowie Sexualfunktionsstörungen (z.B. verringerte Libido, Orgasmusstörungen, Erektionsstörungen), werden mittlerweile zunehmend mehr SRI neueren Typs wie Citalopram verabreicht (SCHWABE & PAFFRATH 2004). Trotzdem stiegen die Verordnungsmengen von Fluoxetin auch 2003 an. Grund hierfür dürfte zum einen die Verfügbarkeit preiswerter Generika nach Ablauf des Patents von Eli Lilly & Co. sein. Hinzu kommt eine verbesserte medizinische Diagnostik von Depressionen (SCHWABE & PAFFRATH 2004). Infolgedessen werden zunehmend mehr Antidepressiva verordnet. Die Verordnung von fluoxetinhaltigen Arzneimitteln lag in Deutschland 2003 bei insgesamt 23,1 Millionen DDD. Eine DDD entspricht 20 mg (WHO 2005), somit kann von einer verordneten Wirkstoffmenge von 4,62 t ausgegangen werden.

Laut der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) wurden in den USA im Jahr 2002 1,2 Billionen Tabletten Fluoxetin an amerikanische Apotheken verkauft, mehr als im Vorjahr (FDA 2003). Aufgrund seiner stimmungsaufhellenden und beruhigenden Wirkung führten viele US-Amerikaner bei Depressionen oder anderen Indikationen verstärkt eine Selbstmedikation mit Fluoxetin durch (OLFSON ET AL. 1998). Laut SCHWABE & PAFFRATH (2004) ist dieser Trend bisher in der Bundesrepublik nicht zu beobachten.

Fluoxetin ist ein weißes bis weißgelbes, kristallines Pulver. Die Substanz wird 6–8 h nach oraler Verabreichung vollständig über den Gastrointestinaltrakt resorbiert und liegt im Blut von Patienten zu 94% an Plasmaproteine gebunden vor. Die Plasmahalbwertszeit beträgt drei Tage (BRUCHHAUSEN ET AL. 1993, SCHWABE & PAFFRATH 2004).

Fluoxetin wird zu ca. 20% als Norfluoxetin bzw. Norfluoxetینگlucuronid ausgeschieden (BRUCHHAUSEN ET AL. 1993). Das verbleibende Fluoxetin wird zu 92–95% extrarenal ausgeschieden, der verbleibende Anteil renal als unverändertes Fluoxetin (2,5%) bzw. als Fluoxetینگlucuronid. Somit gelangen große Teile des ausgeschiedenen Fluoxetins direkt oder zumindestens in einer in Kläranlagen wieder aktivierbaren Form in die Umwelt.



Laut BROOKS ET AL. (2003A, B) besteht noch große Unkenntnis über das Umweltverhalten des Fluoxetins, das Vorkommen von Rückständen in Sedimenten und Gewässern sowie seine potentielle Wirkung auf aquatische Organismen, insbesondere auf aquatische Invertebraten. KOLPIN ET AL. (2002) konnten in Oberflächengewässern der USA Fluoxetinkonzentrationen von 0,012 µg/l nachweisen, METCALFE ET AL. (2003) fanden im Little River (Ontario, Canada) 0.099 µg/l Fluoxetin.

Die Substanz wurde bezogen von Alltech Applied Science Labs, State College, USA.

## 2.2 Auswahl von Sediment und Nährstoffen

Für die Lebenszyklustests mit *C. riparius* wurde ein künstliches Sediment nach OECD (2004) verwendet. Das in der Richtlinie vorgesehene Kaolin wurde jedoch weggelassen, da in Fließwassersedimenten deutlich niedrigere Feinstkornfraktionen als von der OECD-Richtlinie vorgegeben auftreten (DUFT ET AL. 2002). Die Bioverfügbarkeit der Testsubstanzen wäre dadurch in untypischer Weise beeinflusst worden.

Das Sediment bestand somit praktisch ausschließlich aus Quarzsand. Die Korngrößenverteilung war wie folgt: 90–125 µm: 1%, 125–180 µm: 27%, 180–250 µm: 57%, 250–355 µm: 14% und 355–500 µm: 1%. Zusätzlich wurde als Nährstoff je 0,5 Gew.-% gemahlene Erlen- und Brennesselblätter zugefügt.

Das in der OECD-Richtlinie vorgesehene Torfmoos wurde nicht verwendet. Ziel des Versuchs war es, möglichst naturnahe Bedingungen herzustellen; da Torfmoos üblicherweise nicht im Lebensraum von Chironomiden vorkommt, wurden die Blätter von typischerweise am Ufer vorhandenen Pflanzen zugegeben. Aufgrund der Zugabe von Erlen- und Brennesselblättern war eine Fütterung während des Versuchs nicht erforderlich.

Für die Reproduktionstests mit *L. variegatus* wurde ein dem in den Versuchen mit *C. riparius* ähnliches Sediment verwendet. Statt der im oben beschriebenen Sediment verwendeten Mischung aus Erlen- und Brennesselblättern wurden jedoch 1,6 Gew.-% Erlenblätter als Kohlenstoffquelle verwendet. Auch hier wurden weder Kaolin noch Torfmoos verwendet, da beide nach OECD (2004) vorgesehenen Bestandteile nicht im natürlichen Umfeld der Versuchsorganismen vorkommen.

## 2.3 Versuchsorganismen: Bezug und Haltung

Folgende Versuchsorganismen wurden verwendet:

- a) *Chironomus riparius*
- b) *Lumbriculus variegatus*
- c) *Potamopyrgus antipodarum*
- d) *Blepharisma japonicum*
- e) *Tetrahymena thermophila*

Sie wurden wie folgt bezogen und gehalten:

a) *Chironomus riparius*

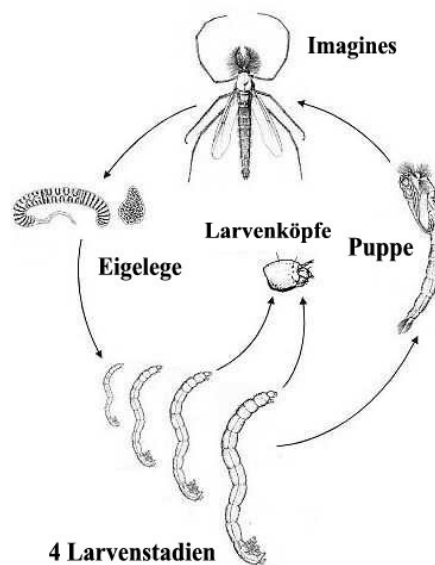
*Chironomus riparius* werden in der Arbeitsgruppe Ökotoxikologie permanent in Kultur gehalten. Die Ausgangspopulation wurde von der Bayer AG in Leverkusen bezogen.

Die systematische Stellung des Versuchsorganismus lautet: Arthropoda - Insecta - Diptera - Chironomidae. Es sind 15000 verschiedene Chironomidenarten bekannt. Die meisten leben im europäischen Raum.

Der Lebenszyklus von *C. riparius* gliedert sich in vier Larvenstadien, Puppenstadium und Imago (Abb. 2.5). Adulte Weibchen legen gelatinöse Gelegestränge. Nach ca. drei Tagen schlüpfen die Larven des ersten Stadiums aus den Eiern. Sie sind wasserlebend, binnen etwa dreizehn Tagen entwickeln sie sich zur Puppe und dann zum Imago. Das Puppenstadium dauert nicht länger als 72 h. Aus der Häutung am Ende des vierten Larvenstadiums geht eine noch stark larval geprägte Puppe hervor, die voll beweglich ist und in der ersten Zeit noch Nahrung zu sich nimmt. In sehr kurzer Zeit erfolgt dann die Umwandlung zur pharaten Puppe, nur wenig später schlüpft die Imago (ARMITAGE ET AL. 1995).

Männchen schlüpfen prinzipiell vor den Weibchen. In den hier durchgeführten Versuchen wurde eine Differenz von durchschnittlich zwei Tagen beobachtet. Grund für den früheren Schlupf der Männchen ist laut ARMITAGE ET AL. (1995) zum einen die Tatsache, dass Weibchen mehr Energie benötigen, da zusätzlich zum Schwarmflug noch ein Eigelege produziert und abgelegt werden muss. Aus diesem Grund verbleiben weibliche Tiere länger im Larvenstadium, um mehr Nahrungsdepots anzulegen. Zum anderen sind, wenn die Weibchen schlüpfen, bereits zahlreiche Männchen vorhanden, so dass ein Paarungserfolg sicherer ist als bei gleichzeitigem Schlupf.

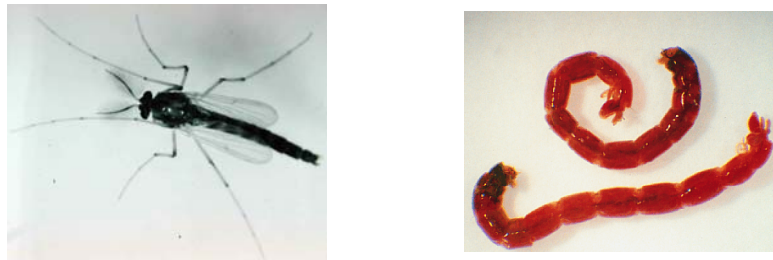
Die Imagines verfügen nur über verkümmerte Mundwerkzeuge und sind nicht fähig, Nahrung aufzunehmen. Die Weibchen werden während der sich dem Schlupf anschließenden Schwarmflugphase befruchtet und sterben nach der Eiablage.



**Abb. 2.5.** Lebenszyklus von *Chironomus riparius* (VOGT 2003)

Chironomiden kommen weltweit vor und besiedeln die unterschiedlichsten Habitate. Auch schwierige klimatische Bedingungen werden ertragen; so sind bestimmte Arten noch bei  $-16^{\circ}\text{C}$  aktiv. Chironomiden leben sowohl auf Ellesmere Island ( $81^{\circ} 49' \text{ N}$ ) als auch am Koshiyama im Himalaya auf 5600 m Höhe. Chironomidenlarven wurden auch im Baikalsee in 1000 m Tiefe entdeckt.

Die hier verwendete Art, *C. riparius*, lebt in enger umrissenen Temperaturbereichen. Nach HAUER & BENKE (1991) leben Chironomidae in einem Temperaturbereich zwischen 10 und  $30^{\circ}\text{C}$ , mit einem Optimum bei etwa  $20^{\circ}\text{C}$ . Höhere Temperaturen wirken hemmend auf die Reproduktion.



**Abb. 2.6.** Männliches Imago und Larven (viertes Stadium) von *Chironomus riparius*  
Aufnahmen: M. OETKEN (2002)

*C. riparius* (Abb. 2.6) ist ein röhrenbauender Sedimentbewohner. Die Larven bauen gespinstausgekleidete Röhren, in denen sie ihren Entwicklungszyklus durchlaufen. Bestimmte Bereiche dieses Gespinnsts sind dazu ausgelegt, Futterpartikel aus der Umgebung herauszufangen. Die Larven ernähren sich, indem sie diese Bereiche komplett fressen. Eine weitere mögliche Ernährungsweise ist das Absuchen der unmittelbaren Röhrenumgebung. Die Röhre wird dabei nicht verlassen. Grundsätzlich gilt, dass die Ernährungsweise entsprechend den Umweltbedingungen variiert. So wurde in der Laborzucht auch beobachtet, dass die Tiere bei Nahrungsknappheit ihre Wohnröhren verließen und auf der gesamten Sedimentoberfläche umherliefen. Gefressen wird vor allem Detritus, als eigentliche Nahrungsquelle dienen die darin enthaltenen Bakterien.

Zur Zucht von *C. riparius* wurde rekonstituiertes Wasser verwendet, um mögliche Schadeinflüsse durch abgestandenes Leitungswasser zu vermeiden. Dazu wurde vollentsalztes Wasser mit Tropic-Marin®-Meersalzmischung auf eine Leitfähigkeit von  $540 \mu\text{S}$  eingestellt. Der pH-Wert wurde auf 7,9–8,4 justiert.

Die Zucht erfolgte in einem mit Fliegengaze bespannten Käfig (70x50x45 cm). In Kristallschalen (900 ml Fassungsvermögen) wurde eine ca. 1,5 cm starke Schicht Quarzsand eingebracht, die anschließend mit rekonstituiertem Wasser überschichtet wurde. Je Schale wurde ein Eigelege eingebracht. Die Fütterung erfolgte zweimal wöchentlich mit Tetra Min® ad libitum. Die Belüftung erfolgte über Glaspipetten. Das Wasser in den Schalen wurde wöchentlich erneuert, pro Woche wurde eine Zuchtschale in der beschriebenen Weise neu angesetzt. Die Zucht erfolgte bei  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$  Raumtemperatur. Es herrschte ein Hell/Dunkel-Rhythmus von 16:8 Stunden.

Für Versuche benötigte Larven wurden direkt nach dem Schlüpfen in die Versuchsansätze eingebracht. Die Gelege wurden direkt nach der Entnahme aus den Zuchtschalen bei Raumtemperatur bebrütet.

b) *Lumbriculus variegatus*

*Lumbriculus variegatus* wird in der Arbeitsgruppe Ökotoxikologie ebenfalls permanent kultiviert. Die Ausgangszucht wurde bezogen von BIO-International (NJ Horn, Niederlande). Die systematische Stellung lautet: Annelida - Clitellata - Lumbriculida - Lumbriculidae.

Die Tiere bewohnen in der freien Natur das Sediment von Seen und langsam fließenden Gewässern, in die Falllaubeintrag erfolgt. Sie ernähren sich von Detritus, indem sie das gesamte Sediment ingestieren und unverdauliche Bestandteile wieder ausscheiden. Frei lebende Tiere pflanzen sich sexuell durch Eiablage fort. Die Fortpflanzungsperiode dauert von April bis August. Außerhalb dieser Zeit erfolgt asexuelle Fortpflanzung durch Querteilung. Unter Laborbedingungen konnte bisher keine sexuelle Fortpflanzung beobachtet werden.

Lumbriculiden repräsentieren den Grundtyp der Oligochaeten, sie stellen jedoch nicht die direkten Vorfahren aller sonstigen Oligochaeten dar. Sie sind ausschließlich Süßwasserbewohner und kommen lediglich in der gemäßigten und der kalten Klimazone der Nordhalbkugel, von Mitteleuropa bis nach Sibirien und von Alaska bis Grönland vor.

*L. variegatus* (Abb. 2.7) ist der einzige aquatische Vertreter der Lumbriculidae in Deutschland. Die Art ist am verbreitetsten in Bächen und Seen der Mittelgebirge, kommt jedoch auch in tieferliegenden Regionen an schattigen Standorten vor.



**Abb. 2.7.** *Lumbriculus variegatus*. Aufnahme: M. OETKEN (2002)

Die Zucht erfolgte in Zehn-Liter-Glasaquarien. In die Aquarien wurde eine ca. zwei Zentimeter hohe Schicht Quarzsand eingebracht, die Becken anschließend mit rekonstituiertem Wasser aufgefüllt. Das Wasser entsprach in Leitfähigkeit und pH dem zur Zucht von *C. riparius* verwendeten. Zu Zuchtbeginn wurden etwa einhundert Würmer in ein Becken eingebracht. Die Fütterung erfolgte täglich mit Tetra Min® ad libitum. Die Zuchtbecken wurden über Glaspipetten belüftet. Die Zucht erfolgte bei  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  Raumtemperatur. Es herrschte ein Hell/Dunkel-Rhythmus von 16:8 Stunden.

c) *Potamopyrgus antipodarum*

*Potamopyrgus antipodarum* wurde ebenfalls im Labor in Dauerkultur gehalten. Die Zucht wurde von Zeit zu Zeit durch Wildfänge aus dem Gievenbach bei Dörenthe (Münsterland) ergänzt. Die systematische Einordnung lautet: Mollusca - Gastropoda - Neotaenioglossa - Hydrobiidae.

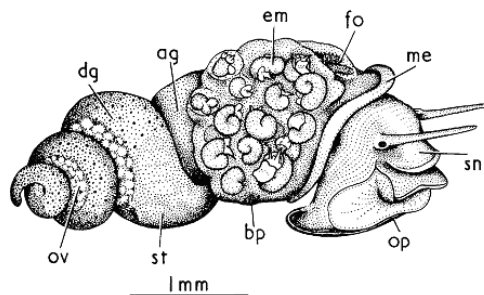
Die ovovivipare *P. antipodarum* (Abb. 2.8) wurde aus Neuseeland nach Europa eingeschleppt, vermutlich mit Ballast- oder Trinkwasser von Schiffen. Der erste Fund erfolgte 1889 in der Themsemündung, möglicherweise leben die ersten Tiere bereits seit 1859 in Europa (PONDER 1988). Um 1900 am europäischen Festland angekommen, breitete sich die Art dann weiter aus. Mittlerweile sind vielerorts Massenvorkommen anzutreffen. FRENZEL (1979) berichtet von bis zu 24000 Individuen/m<sup>2</sup>.



**Abb. 2.8.** *Potamopyrgus antipodarum*. Aufnahme: Prof. Dr. U. Heitkamp, Gleichen-Diemarden  
Abgerufen unter: <http://www.hlug.de/medien/wasser/gewaesserguete/ref/potant.htm>

Lediglich die neuseeländischen Populationen pflanzen sich biparental fort, mit einem diploiden Chromosomensatz von  $2n = 34$ . Australische und europäische Populationen sind ausschließlich parthenogenetisch, mit einem Chromosomensatz von  $2n = 46$  oder 52 (VOLTZOW 1994). Es werden bis auf wenige Einzelfunde (FALNIOWSKI 1979, WALLACE 1979) ausschließlich weibliche Tiere gefunden.

*P. antipodarum* bebrüten ihre Embryonen in einem Brutraum, der aus der für viele weibliche Prosobranchier typischen Kapseldrüse entstanden ist (Abb. 2.9). Die Nachkommen sind in diesem Brutraum nach der Reihenfolge ihres Eintreffens angeordnet, so dass sich im vorderen Bereich, nahe der Vulva, die fertig entwickelten, bereits beschalten Embryonen finden. Weiter proximal schließen sich die noch unbeschalten, weniger entwickelten Embryonen an (DUFT 2003). Die beschalten Embryonen sind zunächst noch von perivitelliner Flüssigkeit umgeben. Ist diese aufgebraucht, werden die Larven durch die Vulva ins Freie entlassen (SCHULTE-OEHLMANN 1997). Aufgrund der hohen Nachkommenzahl genügt bereits ein Weibchen zum Aufbau einer Population, wodurch sich die massenhaften Vorkommen erklären (DUFT 2003).



**Abb. 2.9.** Brutraum von *Potamopyrgus antipodarum* (nach FRETTER & GRAHAM 1994)

Die Schalenhöhe der Tiere erreicht bis zu fünf Millimeter. *P. antipodarum* lebt in den oberen Sedimentschichten von Seen und langsam fließenden Gewässern oder auch auf Hartsubstrat. Die Tiere ernähren sich von Detritus und Aufwuchs. Während kalter Jahreszeiten oder in Trockenperioden zieht sich *P. antipodarum* in tiefere Sedimentschichten zurück.

Unter Laborbedingungen wurde *P. antipodarum* in Zehn-Liter-Glasaquarien gehalten. Die Becken enthielten kein Sediment. Zur Zucht wurde rekonstituiertes Wasser verwendet. Die Leitfähigkeit wurde hier auf 740 µS/cm eingestellt, der pH-Wert betrug 8,4.

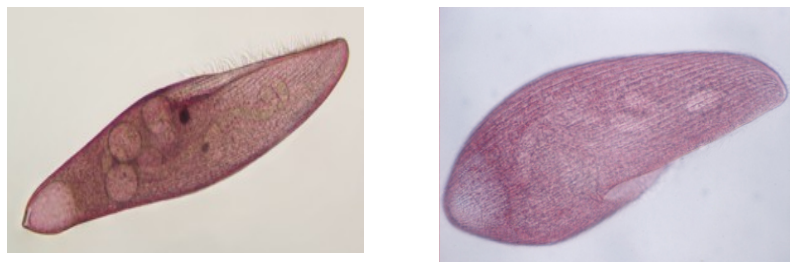
Die Zucht erfolgte bei einem Hell-Dunkel - Rhythmus von 16:8 h bei einer Raumtemperatur von  $17 \pm 1^\circ\text{C}$ . Die Tiere wurden täglich mit Tetra Phyll® ad libitum gefüttert.

d) *Blepharisma japonicum*

Die systematische Stellung dieser Protisten lautet: Protozoa, Ciliata, Heterotrichida, Spirostomidae.

Die Gattung *Blepharisma* wurde von GIESE (1973) ausführlich beschrieben. Als erster führte PERTY (1849, 1852) die Gattung ein, lieferte jedoch nur ungenaue Angaben zur Systematik. Diese ist teilweise immer noch Gegenstand von Diskussionen. GIESE (1973) nennt 47 Arten und Varianten. Die Gattung ist in Europa, Asien, Afrika, Australien, Nord- und Südamerika verbreitet.

Allen Arten von *Blepharisma* ist eine spindelförmige Gestalt gemeinsam (Abb. 2.10). Aufgrund des Pigments Blepharismin sind sie rosa gefärbt. Pigmentgranula sind longitudinal zwischen den Cilienreihen angeordnet. Die Färbung variiert je nach Helligkeit; mit zunehmender Helligkeit verliert sich die Farbe bis zur völligen Entfärbung (GIESE 1973). Da die Tiere üblicherweise in nur schwach durchleuchteten Wasserbereichen leben, sind sie in der Regel deutlich rosa gefärbt. Mit einer Größe von 450 µm ist *B. japonicum* mit bloßem Auge sichtbar. Gelegentlich gehen Blepharismen aus unklarer Ursache zu kannibalistischer Lebensweise über, in solchen Fällen können bis zu 750 µm große Exemplare beobachtet werden. Die Cilien sind ebenfalls in Longitudinalreihen angeordnet, *B. japonicum* verfügt über 25–38 Reihen.



**Abb. 2.10.** *Blepharisma japonicum* Aufnahmen online unter:  
<http://www.kochi-u.ac.jp/~taneda/blepha.html>

Über die Ökologie der Tiere ist relativ wenig bekannt. Die Tiere kommen jedoch ubiquitär in Frisch-, Brack- und Salzwasser vor und wurden sogar in Soletümpeln nachgewiesen (*B. halophilum*). Meistens werden nur wenige Exemplare gefunden, so dass *Blepharisma* bei Routineaufnahmen der Protistenfauna häufig übersehen werden. In gefluteten Reisfeldern können jedoch Massenvorkommen auftreten, SUZUKI (UNVERÖFFENTLICHT, zitiert in GIESE

1973) berichtet von einem Fall, in dem der Ablauf eines gefluteten Reisfeldes durch *Blepharisma* rot gefärbt war.

Während Kälteperioden sowie in Zeiten von Nahrungsmangel oder anderen Verschlechterungen der Umweltbedingungen bildet *Blepharisma* Cysten, die in bestimmten Fällen mehrere Jahre überdauern können und Austrocknung sowie extreme Temperaturen aushalten. Wie alle Protisten vermehrt sich *B. japonicum* durch Quer- und Längsteilung. Der Makronukleus kann dabei zu ungleichen Teilen an die beiden Tochterzellen weitergegeben werden, es erfolgt jedoch stets eine komplette Neubildung.

*Blepharisma* ernährt sich üblicherweise von an verrottendem Pflanzenmaterial wachsenden Bakterien, außerdem von Einzellern (SMITH & GIESE 1967, GIESE 1973). Selbst kleinere Arten können Einzeller wie *Tetrahymena* (50 µm Größe) einstrudeln. Die Nahrung wird mit den Cilien des Peristoms eingestrudelt und anschließend in Nahrungsvakuolen verdaut. Nahrungsreste werden über die Cytopyge ausgeschieden, überschüssige Flüssigkeit über kontraktile Vakuolen.

Abhängig von Temperatur und Nahrungsbedingungen weist *B. japonicum* Generationszeiten zwischen 15 und 40 h auf. Die Haltung im Labor ist prinzipiell recht einfach, es ist jedoch nur schwer möglich, die Tiere in komplett axenischen Medien zu halten. Laut GIESE (1973) verlängern diese die Generationszeiten deutlich. *Blepharisma* können bei Temperaturen zwischen 7,5 und 38 °C leben. Die höchsten Wachstumsraten werden jedoch in einem Temperaturbereich zwischen 15 und 30 °C beobachtet, die Teilungsrate nimmt mit steigender Temperatur zu.

Durch die Pigmentierung mit Blepharimin ist *Blepharisma* sehr photosensibel. Tiere, die Starklicht ausgesetzt sind, sterben binnen kurzer Zeit aufgrund von Photooxydation des Pigments. Bei normalem Tageslicht wird das Pigment ausgestoßen, so dass die Zellen ausbleichen. Blepharimin hat vor allem zwei Funktionen; zum einen absorbiert es kurzwelliges UV-Licht und schützt so die Zellen vor DNA-Schäden. Eine Photooxydation tritt hierbei nicht ein. Zum zweiten ist Blepharimin wahrscheinlich toxisch für Fressfeinde. Zumindestens konnte beobachtet werden, dass von *Actinosphaerium* gefressene Blepharismen wieder ausgeschieden wurden, sobald der Räuber beleuchtet wurde und seine Beutetiere angingen, Blepharimin freizusetzen (GIESE 1973). Schwachlicht bewirkt eine unschädliche Oxydation des Pigments zu Oxyblepharimin. Dieses hat in etwa das gleiche Absorptionspotential für kurzwelliges UV-Licht, jedoch keine photooxydativen Eigenschaften.

Die Stammkultur zur hier verwendeten *Blepharisma*-Zucht wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Piero Luporini, Universität Camerino, Italien, zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden in monoxenischem, polybakteriellem Medium gehalten. Das Medium bestand aus Quellwasser (Volvic®), dem sterilisierte Reiskörner zugesetzt wurden. Mit dem Überimpfen der Blepharismen wurden aus der Vorgängerkultur ausreichend Bakterien übernommen, um die Ernährung der Kultur sicherzustellen.

*B. japonicum* wurde in 50 ml-Glaspetrischalen kultiviert. Die Kulturen wurden einmal monatlich überimpft. Kultiviert wurden die Einzeller bei Raumtemperatur (25 ± 3°C) in Dunkelheit.

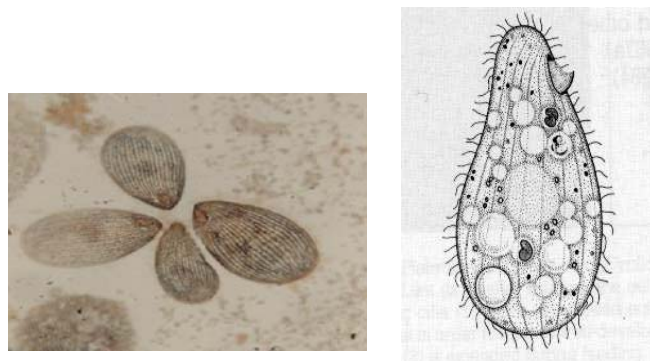
e) *Tetrahymena thermophila*

Die systematische Stellung dieses Protisten lautet: Protozoa - Ciliata - Hymenostomatida - Tetrahymenidae.



Die Gattung *Tetrahymena* wurde mehrfach ausführlich beschrieben, verschiedentlich unter anderem Namen, z. B. *Glaucoma* (ELLIOTT, 1973). Die Systematik blieb noch längere Zeit unklar. Die Art *Tetrahymena thermophila* wurde erst 1976 endgültig beschrieben, vorher galt sie als Zwillingsart der bekanntesten Art der Gattung, *Tetrahymena pyriformis*. Nach ELLIOTT (1973) wurden die ersten *Tetrahymena* bereits 1676 von Leeuwenhoek beschrieben. Eine grundsätzliche Revision aufgrund von ssu-rRNA-Molekülen lieferte SOGIN (1991).

Die Arten der Gattung *Tetrahymena* sind größtenteils freilebend, es existieren jedoch auch parasitische Formen, z. B. *Tetrahymena chironomi*. Die überwiegende Mehrheit der Arten lebt aquatisch, doch auch einige terrestrische Formen existieren (ELLIOTT 1973).



**Abb.2.11.** *Tetrahymena* sp. (Aufnahmen unter:

<http://www.zoology.ubc.ca/courses/bio332/Labs/CiliateProject/tetrahymena/tetpic.jpg> und [http://www-biol.paisley.ac.uk/biomedial/text/txt\\_pictures.htm](http://www-biol.paisley.ac.uk/biomedial/text/txt_pictures.htm))

Die nichtparasitischen Formen von *Tetrahymena* ernähren sich überwiegend von Bakterien und Hefen, auch Coprophilie wurde beschrieben (ELLIOTT 1973). Übergänge zum Parasitismus sind jedoch auch in normal freilebenden Arten möglich, so z. B. bei *T. pyriformis*, die bei massenhaftem Vorkommen Invertebraten, im Extremfall auch Fische parasitieren können. (ELLIOTT 1973). Da die Literatur vor 1976 *T. thermophila* als Zwillingsart von *T. pyriformis* beschrieb, ist ein solches Verhalten auch für *T. thermophila* möglich.

*Tetrahymena* sind circa 50 µm lang und 20 µm breit. Die Tiere sind birnenförmig (Abb. 2.11), der Mundapparat ist im anterioren Viertel der Zelle, an der ventralen Seite lokalisiert. Der Name *Tetra*-hymena rührt vom Mundapparat her, der aus vier membranösen Elementen besteht, einer undulierenden Membran und vier Membranellen. Die Cilien sind in Längsreihen angeordnet, *T. thermophila* weist durchschnittlich 23 Reihen von Cilien auf (HAUPTMANN 2000, ELLIOTT 1973). Wie auch bei *B. japonicum*, liegt Kerndimorphismus vor (Mikro- und Makronukleus). Zellorganellen, Membranstruktur und Endoplasmatisches Retikulum sind ausführlich beschrieben in FRANKEL (2000). Aufgrund der bestens erforschten Zellstrukturen und des gut bekannten Genoms ist *Tetrahymena* zum bevorzugten Modellorganismus in der Zellbiologie geworden. *T. thermophila* ist in weiten Teilen Nord- und Südamerikas sowie Europas anzutreffen. Die Art bewohnt nicht nur Teiche und Bäche, sondern auch Thermalquellen und Salzmarschen. In polyxenischen, multibakteriellen Medien bilden die Tiere oft wolkenartige Formationen um vorhandenen Detritus. Dies konnte auch im Verlauf dieser Arbeit beobachtet werden. FLORIN-CRISTENSEN ET AL. (1989) erklären dies mit der größeren Effektivität ausgeschiedener Exoenzyme. In flachen Kulturschalen zeigen sich oft auch polygone Schwimmmuster (HILL 1972).



Die Art vermehrt sich ausschließlich durch Zellteilung, unter guten Kulturbedingungen liegt die Generationsdauer bei etwa 2 h (ORIAS ET AL. 2000). Die Laborkultur von *T. thermophila* erfolgte in PPY-Medium nach HAUPTMANN (2000). Die Kulturen wurden bei 28 °C im Klimaschrank aufbewahrt und wöchentlich überimpft. Parallel erfolgte eine Dauerkultur in Reagenzgläsern auf in Aqua demin. autoklavierten Kichererbsen. Diese Kultur wurde alle drei Monate überimpft.

*Tetrahymena* werden seit langer Zeit in Toxizitätstests benutzt (EPSTEIN ET AL. 1967, YOSHIOKA 1985, NILSSON 1989, BAMDAD ET AL. 1995, GONZALEZ ET AL. 2004). Sie dienen zunehmend als Ersatzorganismen für Testverfahren mit Vertebraten (SCHULTZ 1997). Vornehmlich dient die Wuchshemmung in einer Kultur als Endpunkt. Ein entsprechender internationaler Ringtest erfolgte 1997 (LARSEN ET AL. 1997).

SAUVANT ET AL. (1995) beschrieben eine Methode, die Zelldichte von *Tetrahymena*-Kulturen photometrisch zu messen. Der hier durchgeführte Test orientierte sich an dieser Methode.

## 2.4 Versuchsaufbau

### 2.4.1 Akuttest mit *Chironomus riparius* und *Lumbriculus variegatus*

Die Akuttests mit *C. riparius* wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Pro Well wurde eine Larve im ersten Larvenstadium eingesetzt. Als Testmedium diente das rekonstituierte Wasser nach 2.3 a), dem die Testsubstanz in benötigter Menge aus einer Stammlösung zugesetzt wurde. Jede Larve wurde in 200 µl exponiert. Die Dauer des Tests betrug 24 h. Längere Tests waren nicht möglich, da die Larven ohne Fütterung nicht länger überlebten. Pro Behandlungsstufe wurde ein Replikat mit acht Larven eingesetzt.

Nach 24 h wurde der Zustand untersucht. Bewegliche Larven galten hierbei als unbeeinflusst, unbewegliche als tot. Protokolliert wurden ebenfalls deformierte und eindeutig lysierte Larven.

Die Akuttests mit *L. variegatus* wurden ebenfalls in 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Pro Well wurde ein Tier eingesetzt. Als Testmedium diente das rekonstituierte Wasser nach 2.3 a), dem die Testsubstanz in benötigter Menge aus einer Stammlösung zugesetzt wurde. Jeder Wurm wurde in 200 µl exponiert. Die Dauer des Tests betrug 96 h. Pro Behandlungsstufe wurde ein Replikat mit acht Würmern eingesetzt.

Die Ansätze wurden täglich kontrolliert. Bewegliche Würmer galten hierbei als unbeeinflusst, unbewegliche und eindeutig lysierte als tot. Protokolliert wurden ebenfalls subletale Effekte (Deformationen, Unterbrechung des Blutkreislaufes, erhöhte Defäkation, erbrochener Darminhalt). Ebenfalls wurden Fälle von Morphallaxis registriert um mögliche, die Reproduktion beeinflussende Effekte festzustellen.

### 2.4.2 Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*

Die Lebenszyklustests wurden über eine Versuchsdauer von 30 Tagen durchgeführt. Pro Behandlungsstufe wurden vier Replikate eingesetzt, ein fünftes Replikat wurde mit angesetzt und zu Versuchsbeginn für die Rückstandsanalytik entnommen (Sediment und Überstandswasser wurden getrennt und bis zur Analyse tiefgefroren aufbewahrt). Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle mit unbelastetem Sediment berücksichtigt, außerdem für die Versuchssub-

stanzen Carbamazepin und Clofibrinsäure eine Lösemittelkontrolle. Als Lösemittel diente Ethylacetat. Ethanol wurde nicht verwendet, da sich zeigte, dass ethanolbehandelte Ansätze verstärkt zu Schimmelbildung neigten.

Der Versuch wurde in 600-ml-Bechergläsern durchgeführt (Abb. 2.12). Pro Becherglas wurden 100 g der unter 2.2 beschriebenen Sedimentmischung eingewogen. Die Ansätze der Negativkontrollen wurden ohne weitere Behandlung mit 400 ml rekonstituiertem Wasser (Parameter wie in 2.3) überschichtet.

Die Versuchssubstanz wurde folgendermaßen in die einzelnen Ansätze eingebracht: Aus der jeweiligen Substanz wurde mit Ethylacetat zunächst eine höher konzentrierte Stammlösung hergestellt. Aus dieser wurde anschließend mittels Eppendorf-Pipette eine Menge entnommen, die die pro Ansatz benötigte Menge an Versuchssubstanz enthielt. Dieses Aliquot wurde mit Lösemittel auf 30 ml aufgefüllt. Durch das so vergrößerte Volumen war gewährleistet, dass das Sediment ohne weiteres Vermengen völlig durchtränkt und die Versuchssubstanz gleichmäßig verteilt wurde. Das Sediment wurde mit dem Lösemittel/Substanzgemisch getränkt, das Lösemittel wurde anschließend bei Raumtemperatur unter dem Abzug bis zur Trockne abgedampft. Das Sediment wurde danach mit 400 ml rekonstituiertem Wasser überschichtet (Tag -14). Die Gläser wurden mit Gaze verschlossen und über Glaspipetten belüftet. Verdunstetes Wasser wurde in allen Ansätzen über die gesamte Versuchsdauer regelmäßig ersetzt. Nach einer vierzehntägigen Equilibrationsphase wurden pro Ansatz 20 frisch geschlüpfte Larven des ersten Larvenstudiums eingesetzt (Tag 1). Die Versuche wurden bei 70% Luftfeuchtigkeit,  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  Raumtemperatur und einem Hell/Dunkel-Rhythmus von 16:8 Stunden durchgeführt.

Die vierzehntägige Sedimentalterungsphase wurde bei allen Versuchen eingehalten, um die Vergleichbarkeit der Verhältnisse zu gewährleisten. Im Versuch mit Ciprofloxacin wurde von der Methode insoweit abgewichen, als dass sämtliche Ansätze zunächst mit unbelastetem Wasser überschichtet wurden und dann elf Tage lang unter den oben beschriebenen Klimabedingungen belüftet im Versuchsraum standen. Am 12. Tag wurde das Wasser abgegossen und die pro Ansatz benötigte Menge Ciprofloxacin in 30 ml Wasser gelöst auf das Sediment aufgebracht. Das Sediment wurde gründlich durchmischt und anschließend mit 400 ml Wasser überschichtet. Diese Methode wurde gewählt, da Ciprofloxacin stark lichtempfindlich ist. Bei Einbringen der Versuchssubstanz zu Beginn der Equilibrationsphase wäre zum Zeitpunkt des Einsatzes der Larven kein nennenswerter Gehalt an Ciprofloxacin mehr zu erwarten gewesen (PHILIPPS ET AL. 1990, TIEFENBACHER ET AL. 1994, TRITTLER, PERS. MITTEILUNG 2003).

Zu Versuchsbeginn und -ende wurden pH-Wert, Sauerstoffgehalt und Leitfähigkeit des verwendeten Wassers bestimmt. Ab dem elften Versuchstag wurde mit der Überwachung des Schlupfes begonnen. Geschlüpfte Mücken wurden alle 24 Stunden aus den Versuchsgefäßen mit einem Exhaustor abgesaugt, getrennt nach männlichen und weiblichen Tieren registriert und in gazeverschlossene 600-ml-Bechergläser umgesetzt, die mit ca. 100 ml rekonstituiertem Wasser gefüllt waren. In diesen Gefäßen wurde die Eiablage überwacht.

Vorhandene Eigelege wurden entfernt und in Gewebekulturplatten mit 24 Vertiefungen mit 2 M Schwefelsäure behandelt (ein Gelege pro Vertiefung). Hierdurch wurde die Gallerte, die die einzelnen Eier zusammenhielt, aufgelöst, so dass sich die Eier auf dem Boden der Vertiefung anordneten. Das Gelege wurde nunmehr fotografiert und die Eier auf dem Bild gezählt.

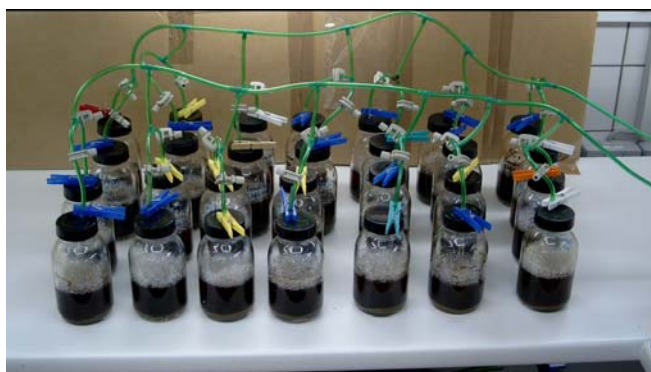


**Abb. 2.12.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*

Nach 30 Tagen wurden die Wasserparameter erneut aufgenommen und die Tests anschließend beendet. Ein Replikat wurde zur Rückstandsanalytik benutzt. Ausgewertet wurden der Schlupferfolg, die mittlere Emergenzzeit, die Zahl der Gelege pro Behandlungsstufe und die Eizahl pro Gelege.

#### 2.4.3 Reproduktionstest mit *Lumbricus variegatus*

Die Reproduktionsversuche mit *L. variegatus* wurden über eine Dauer von 28 Tagen durchgeführt. Im Unterschied zu den Versuchen mit *C. riparius* wurden 500-ml-Schraubdeckelgläser benutzt, in die pro Ansatz 40 g Sediment gemäß Abschnitt 2.2 eingebracht wurde (Abb. 2.13). Überschichtet wurde mit 200 ml rekonstituiertem Wasser. Die Behandlung des Sediments, Analytik, Equilibrationsphase, Ersatz verdunsteten Wassers und die Erhebung der chemisch-physikalischen Parameter erfolgten analog zu Punkt 2.4.2.



**Abb. 2.13.** Reproduktionstest mit *Lumbricus variegatus*

Pro Replikat wurden zehn *L. variegatus* eingesetzt. Vier Wochen vor dem Einsatz der Versuchstiere (Tag -28) wurden die Würmer in entsprechender Anzahl mit einem Skalpell halbiert. Vorder- und Hinterenden wurden anschließend getrennt in belüfteten Bechergläsern mit rekonstituiertem Wasser auf Glasperlen gehalten, bis sich zu Versuchsbeginn an den

Hinterenden ein neuer Kopf regeneriert hatte. Auf diese Weise war sichergestellt, dass alle eingesetzten Würmer bei Versuchsbeginn im selben reproduktiven Stadium waren. Nach 28 Tagen wurden die Tiere eingesetzt (Tag 0), nach vierwöchiger Versuchsdauer (Tag +28) wurde die Anzahl der Würmer im Sediment bestimmt. Unterschieden wurde dabei zwischen „großen“ Würmern, deren Querteilung seit längerer Zeit vollendet war sowie „kleinen“ Würmern, Tieren, die sich sichtlich erst vor kurzer Zeit reproduziert hatten. Hierbei wurde noch zwischen vollständiger und unvollständiger Vollendung der Vorder- bzw. Hinterendenbildung unterschieden. Auch deformierte Tiere, soweit vorhanden, wurden separat registriert.

Im Anschluss an die Auszählung wurde die Biomasse aller Würmer eines Replikates ermittelt. Hierzu wurden die Tiere in tarierten Eppendorf®-Reaktionsgefäßen bei 40 °C im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und die Biomasse durch Wiegen ermittelt.

Ausgewertet wurden die Gesamtzahl der Würmer, das Verhältnis von großen zu kleinen Würmern und die Gesamtbiomasse im Vergleich der Behandlungsstufen.

#### 2.4.4 Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*

Die Versuche wurden in 1-Liter-Erlenmeyerkolben durchgeführt (Abb. 2.14). Als Testmedium diente das unter 2.3 c) beschriebene rekonstituierte Wasser. Die jeweilige Testsubstanz wurde aus einer Stammlösung in der benötigten Menge hinzupipettiert. Pro Behandlungsstufe wurden drei Replikate eingesetzt. Die Kolben wurden über Glaspipetten belüftet. Zweimal wöchentlich wurde das Testmedium erneuert und neue Testsubstanz zugegeben. Die Wasserparameter wurden einmal pro Woche überprüft. Die Fütterung erfolgte täglich ad libitum mit Tetra Phyll®.



**Abb. 2.14.** Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*

Pro Replikat wurden 80 Tiere eingesetzt. Als Auswahlkriterium diente die Schalenhöhe; es wurden nur Tiere mit einer Schalenhöhe von mindestens 3,6 mm verwendet. Ab dieser Höhe kann davon ausgegangen werden, dass die Schnecken ein Alter erreicht haben, in dem sie zur Reproduktion fähig sind. Tiere mit einer Schalenhöhe über 4,5 mm wurden ebenfalls aussortiert.

Im Versuch mit Carbamazepin erfolgten die Auswertungen nach 7, 14, 21 und 28 Tagen. Die Intervalle wurden in den Versuchen mit Clofibrinsäure und Ciprofloxacin auf 14, 28 und 56 Tage verändert, um zu überprüfen, ob sich nach einer längeren Einwirkzeit Effekte

ergeben, die bei kürzerer Wirkdauer nicht erfasst wurden. Im Versuch mit Fluoxetin wurde zur feineren Effekterfassung eine zusätzliche Auswertung nach 21 Tagen durchgeführt. Zum Zeitpunkt T0 wurde die Embryonenzahl von 20 zufällig der Zucht entnommenen Tieren bestimmt. Dieser Wert diene als Nullwert für den Versuch. An den jeweiligen Auswerttagen wurden pro Replikat ebenfalls 20 Tiere entnommen und in 2,5%iger  $\text{MgCl}_2$ -Lösung narkotisiert. Als Hilfsparameter wurden zunächst die Schalenhöhe und die Weite der Mundöffnung bestimmt. Anschließend wurde die Schale aufgebrochen und die Bruttasche freigelegt. Die Embryonen wurden aus der Bruttasche entnommen und getrennt nach beschalten und unbeschalten Embryonen ausgezählt.

Als Endpunkte dienten die Anzahl der beschalten und unbeschalten Embryonen sowie die Mortalität.

#### 2.4.5 Destruentenmikrokosmostest

Der Versuch wurde in hitzesterilisierten 50-ml-Glaspetrischalen durchgeführt. Als Testmedium diente autoklaviertes Volvic®-Wasser. Zugesezt wurden 0,8 g *Tetrahymena*-Konzentrat. Dieses Konzentrat wurde gewonnen, indem 100 ml *Tetrahymena*-Kultur bei 1900 rcf sechs Minuten lang zentrifugiert wurden. Das überstehende Medium wurde verworfen, das Pellet zweimal mit 1 ml Volvic gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach dem zweiten Waschgang wurde das Pellet in 1 ml Volvic® aufgenommen und in ein Eppendorf®-Gefäß überführt. Es wurde erneut zentrifugiert, die Wasserphase verworfen und das Konzentrat bis zur Verwendung eingefroren. Pro Versuchsansatz wurden außerdem zwei sterilisierte Reiskörner zugeetzt.



**Abb. 2.15.** Destruentenmikrokosmos

Die Versuchsdauer betrug fünf Tage. An jedem Tag wurden drei Replikate einer Behandlungsstufe ausgewertet, somit wurden pro Behandlungsstufe zwölf Replikate eingesetzt. Die Versuchssubstanz wurde in benötigter Menge einer Stammlösung entnommen und der Gesamtmenge des verwendeten Testmediums zugesezt. Als Positivkontrolle diente zunächst Chrom (als  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ). In den Versuchen mit Fluoxetin zeigte sich, dass diese Lösung einen zu niedrigen pH-Wert aufwies, daher wurde in den übrigen Versuchsreihen Cadmium (als  $\text{CdSO}_4$ ) verwendet. Anschließend wurde das Medium mit sterilisierten Messzylindern auf die Schalen verteilt. Pro Ansatz wurden zehn *B. japonicum* zugesezt. Für die Zugabe von *Tetrahymena* musste zunächst das PPY-Medium entfernt werden, da es für *B. japonicum* unverträglich war. Zu diesem Zweck wurden 10 ml aus der *Tetrahymena*-Stammkultur entnommen und sechs Minuten bei 1900 rcf zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 1

ml Volvic® aufgenommen. Pro Versuchsansatz wurden 100 µl dieser Suspension zugefügt. Abbildung 2.15 zeigt einen Destruentenmikrokosmos.

Pro Behandlungsstufe wurden täglich drei Replikate ausgewertet. *B. japonicum* wurde gezählt. Bei einer Blepharismenzahl >400 erfolgte eine Abschätzung, hierzu wurden vier Aliquots à 250 µl ausgezählt. Die hieraus gebildete Durchschnittssumme wurde auf den Schaleninhalt hochgerechnet, indem mit 120 multipliziert wurde.

Die Entwicklung von *T. thermophila* wurde indirekt ausgewertet, indem mit einem Mikrotiterplattenreader (Multiskan Ascent®) die Extinktion bei 540 nm gemessen wurde. Hierzu wurde der gesamte Versuchsansatz sechs Minuten bei 1900 rcf zentrifugiert, das Pellet in 1 ml aufgenommen und in einer 96-Well-Mikrotiterplatte auf fünf Aliquots à 200 µl verteilt. Von diesen Aliquots wurde die Extinktion gemessen.

Als Endpunkte dienten somit die Anzahl der Blepharismen und die relative Dichte der *Tetrahymena*.

## 2.5 Statistik

Zur statistischen Auswertung der Daten wurden die Programme stateasy® und Prism® für Windows XP (Version 4.03, GraphPad Software, San Diego, USA) verwendet.

Zum direkten Vergleich der Mittelwerte aus den Daten zweier Replikate wurde zunächst mit den Testverfahren nach Kolmogorov-Smirnoff und D'Agostino & Pearson (omnibus normality test) auf Normalverteilung geprüft (5% Irrtumswahrscheinlichkeit). Die Homogenität der Varianzen wurde mit dem Bartlett-Test untersucht. Waren die Voraussetzung gegeben, wurden die Mittelwerte mit einer einseitigen Varianzanalyse (one-way-ANOVA) verglichen. Sofern keine Normalverteilung vorlag, die Varianzen inhomogen waren oder die Replikatzahl für eine ANOVA zu gering war, wurde der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test benutzt.

Als Post-Hoc-Tests nach einer ANOVA dienten die Verfahren nach Dunnett bzw. Bonferroni. Verglichen wurde jede Behandlungsstufe gegen die Kontrolle, bzw., soweit vorhanden, gegen die Lösemittelkontrolle. Sofern ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt wurde, folgte im Anschluss ein Dunn-Post-Hoc-Test, mit dem ebenfalls die einzelnen Behandlungsstufen gegen die Kontrolle verglichen wurden. Um die statistische Mächtigkeit der Post-Hoc-Tests zu erhöhen, wurden nicht alle Ansätze gegeneinander verglichen.

Die EC<sub>50</sub> für die Reproduktionstests mit *P. antipodarum* wurden mit nach folgender Formel

$$\text{berechnet: } y = C \cdot \exp\left(-\ln(2) \cdot \left(\left(\frac{x}{EC_{50}}\right)^b\right)\right).$$

Hierbei sind:

y =	gemittelte Embryonenzahl
C =	Embryonenzahl
x =	Konzentration
EC <sub>50</sub> =	Konzentration, bei der 50% des untersuchten Effekts auftreten
b =	Steigung

Die  $EmT_{50}$  für *C. riparius* wurde wie folgt berechnet: Die Zahl der geschlüpften Mücken wurde gleich 100% gesetzt. Unterschiede in der Schlupfzahl wurden durch Logarithmieren (ln) ausgeglichen. Die  $EmT_{50}$  wurden mit Prism in kumulativer Logistik nach folgender Formel berechnet:

$$y = \frac{c(\exp(b(xEmT_{50})))}{(1 + \exp(b(x - EmT_{50})))}$$

Delogarithmierung der erhaltenen Werte lieferte die  $EmT_{50}$ .  
Hierbei sind:

y = Anzahl geschlüpfter Mücken - getrenntgeschlechtlich und kumuliert  
x = logarithmierter Schlupfzeitpunkt  
c = maximaler Schlupferfolg, stets 100%  
b = Steigung  
 $EmT_{50}$  = mittlere Emergenzzeit für Männchen und Weibchen

Die  $EmT_{50}$  wurde getrennt für Männchen und Weibchen berechnet. Die statistische Signifikanzprüfung erfolgte nach SPRAGUE & FOLGELS (1977).

## 2.6 Rückstandsanalytik

### 2.6.1 Carbamazepin

Die Analyse wurde durch Dr. Dirk Löffler und Dr. Thomas Ternes an der Bundesanstalt für Gewässerkunde vorgenommen. Aus den Sedimentproben wurden Aliquots von 1,5 g entnommen. Diese wurden in einem Zentrifugenrohr in drei Schritten mit organischen Lösemiteln im Ultraschallbad extrahiert. Im ersten Extraktionsschritt wurden 5 ml eines Gemischs aus Methanol und Ethylacetat (50:50, v:v) benutzt, in den zwei folgenden Schritten je 5 ml Ethylacetat. Die Proben wurden 15 Minuten ultraschallbehandelt und anschließend sieben Minuten bei 5400 U/min zentrifugiert. Die Extrakte wurden vereinigt und im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingeeengt. Die Extrakte wurden in 3 ml Methanol zurückgelöst und mit 500 ml Grundwasser verdünnt. Das verwendete Grundwasser war laut LÖFFLER (2003) frei von anthropogener organischer Kontamination. Die Proben wurden über Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) nach der Methode von Ternes angereichert (TERNES 2001, TERNES ET AL. 2001); die Anreicherung diente zugleich als Reinigungsschritt. Zur Anreicherung wurden die mit Grundwasser verdünnten Proben, soweit erforderlich, mit 3,5 molarer  $H_2SO_4$  auf einen neutralen pH-Wert (7,0–7,5) eingestellt. Als Surrogatstandard diente 10,11-Dihydrocarbamazepin (Alltech, USA). Angereichert wurde mit Glaskartuschen, die manuell mit 500 mg RP-C<sub>18</sub>ec-Material (ICT, Bad Homburg) gefüllt wurden. Vor der Anreicherung wurden die Kartuschen mit 6 ml n-Hexan, 2 ml Aceton, 10 ml Methanol und 10 ml Grundwasser konditioniert. Die Proben wurden mit einer Fließgeschwindigkeit von 20 ml/min auf die Kartuschen gegeben. Die Kartuschen wurden anschließend eine Stunde im Stickstoffstrom getrocknet und mit 4 x 1 ml Methanol eluiert. Das Eluat wurde zur Trockne eingeeengt und schließlich in 50 µl Methanol und 450 µl Phosphatpuffer (20 mM  $KH_2PO_4/K_2HPO_4$ , pH 7) aufgenommen.

Die Proben wurden auf einem Agilent 1100 HPLC System bei 25°C mit anschließender Filtration aufgetrennt (Trennsäule: 100x4,6 mm Chromolith Performance RP-18ec 100, Merck,

Darmstadt). Als Eluent A diente ein Gemisch aus 100 ml Acetonitril und 900 ml Wasser mit 5 mmol/L Ammoniumacetat (pH 5,7). Eluent B bestand aus 40% Eluent A und 60% Acetonitril. Eluent A wurde zwei Minuten gehalten, in einem linearen Gradienten wurde sodann zu 100% Eluent B übergegangen, dann wiederum binnen 0,5 min zurück zu 100% Eluent A, der dann für 6,5 Minuten gehalten wurde. Es wurde eine Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min gewählt. Das Einspritzvolumen war immer 10 µl. Carbamazepin wurde auf einem API 4000 triple stag quadrupole-Massenspektrometer mit Turbo-Elektrospray-Ionisierung analysiert. Die Wiederfindungsraten wurden relativ zu einem nicht angereicherten Standard berechnet; sie lagen zwischen 102% und 125%. In jeder Kalibration wurden eine Blindprobe und eine definierte Probe benutzt. Das Quantifizierungslimit war als zweitniedrigster Punkt in der linearen Regression definiert, solange das S/N Verhältnis >10 war.

### 2.6.2 Clofibrinsäure

Die Analyse erfolgte ebenfalls durch Dr. Dirk Löffler und Dr. Thomas Ternes an der Bundesanstalt für Gewässerkunde. Die Proben wurden zuerst filtriert (Spartan-Filter, 0,45 µm Porenweite). Eine Anreicherung war nicht erforderlich. Die Analyse erfolgte an einem Perkin-Elmer HPLC-System (Series 200 in-line degasser mit quarternärer Pumpe, AS-2000a-Autosampler). Es wurde eine 125 x 3 mm LiChrospher® RP-18-Säule verwendet (Merck, Darmstadt), die Temperatur der Säule wurde bei 25 °C gehalten. Das Einspritzvolumen betrug 50 µl. Die mobile Phase bestand aus Acetonitril und Milli-Q-Wasser, dass auf einen pH von 2,9 eingestellt wurde. Zu Beginn der Analyse bestand die mobile Phase aus 40% Acetonitril und 60% Milli-Q-Wasser, nach 3 Minuten erfolgte ein Übergang zu 100% Acetonitril, nach 18 Minuten wurde zum ursprünglichen Gemisch zurückgekehrt. Die Retentionszeit betrug 9,7 Minuten. Die Anreicherungsgrenze lag bei 0,04 µg/l, die absolute Wiederfindungsrate bei 71 ± 7%. Das Precursor-Ion wurde bei 127,0 m/z detektiert, das Produkt-Ion bei 85,1 m/z. Die Nachweisgrenze betrug 0,4 ng/g.

### 2.6.3 Ciprofloxacin

Die Analyse erfolgte durch Dr. Rainer Trittler und Prof. Dr. Klaus Kümmerer am Institut für Umweltmedizin der Universitätsklinik Freiburg. Die Sedimentproben wurden zunächst 15 Minuten lang im Ultraschallbad mit 1 N Salzsäure extrahiert. Diese Extrakte und die Wasserproben wurden vor der Festphasenextraktion zunächst 10 Minuten bei 1900 rcf zentrifugiert, dann dreimal mit abnehmender Porenweite über Cellulosefilter filtriert.

Anschließend erfolgte eine Festphasenextraktion an Chromabond®-C18 LV Polypropylen-säulen (500 mg Sorbens, 15 ml Reservoir). Die Säulen wurden zuvor mit 4 ml Methanol und 4 ml Probenmatrix konditioniert. Anschließend wurden die Kartuschen mit 4 ml Methanol eluiert. Das Eluat wurde im Stickstoffstrom auf ca. 0,5 ml eingeeengt und in HPLC-Vials überführt. Zur Erfassung des eluierten Ciprofloxacins wurde das ursprüngliche Eluatgefäß noch zweimal mit 0,5 ml Methanol gespült, zur Lösung an den Wänden befindlicher Reste erfolgte eine kurze Ultraschallbehandlung. Die insgesamt 1,5 ml Methanol wurden zur Trockne eingeeengt, der Rückstand in 1 ml Aqua demin. aufgenommen. Die Analyse erfolgte nach der Methode von KÜMPEL ET AL. (1999). Die Nachweisgrenze betrug 100 ng/ml.



#### 2.6.4 Fluoxetin

Die Rückstandsanalytik wurde von der Medizinisches Labor Bremen GmbH durchgeführt. Wasserproben aus dem *P. antipodarum*-Reproduktionstest (entnommen beim Wasserwechsel direkt nach Zugabe des Testmediums sowie nach 24, 48 und 72 Stunden) und dem Lebenszyklustest mit *C. riparius* sowie methanolische Sedimentextrakte (zu Testbeginn und -ende entnommen) wurden untersucht. Die Sedimentproben wurden im Verhältnis 1:1 mit Methanol überschichtet und eine Stunde im Ultraschallbad extrahiert. Die Proben wurden auf einer HPLC-Säule, Chromolith Speed ROD C<sub>18</sub> 5 µm 50 x 4,6 mm, aufgetrennt. Als mobile Phase diente ein Gemisch aus Acetonitril und 5 mM Essigsäure (36:64, v/v), das mit Ammoniak auf pH 3,9 eingestellt wurde. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Anschließend wurden die Proben mit einem API 4000 Massenspektrometer mit Turbo-Ion-Spray-Interface und positivem MRM-Modus analysiert. Bei einer Retentionszeit von zwei Minuten erfolgte die Trennung des Fluoxetin-Moleküls bei 310,1 m/z, Trennung des Fragmentions bei 148,1 m/z. Wurde eine Retentionszeit von 1,8 Minuten benutzt, lagen diese Werte bei 296,1 m/z und 134,1 m/z. In der Analyse wurden die Fragmentionen quantifiziert. Die Validierungsdaten wurden vom Labor wie folgt mitgeteilt: In einem linearen Bereich von 5–500 µg/l betrug die Bestimmungsgrenze 0,6 µg/l. Die serielle Präzision lag bei 11,4%, die Wiederfindungsrate betrug 111%.

### 3. Ergebnisse

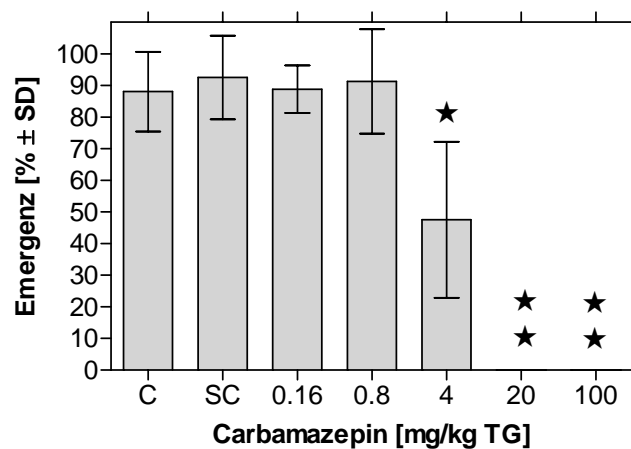
#### 3.1 *Chironomus riparius*

##### 3.1.1 Carbamazepin

###### Versuchsserie I

Die Serie I wurde am 01.06.2002 mit der Belastung der Sedimente begonnen. Am 15.06.2002 wurden die Larven eingesetzt.

###### 1.) Emergenz



**Abb. 3.1.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Carbamazepin. Serie I, Emergenz. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple Comparison Test, ★ =  $p < 0,05$ ; ★★ =  $p < 0,01$ . Je 4 Replikate à 20 Larven

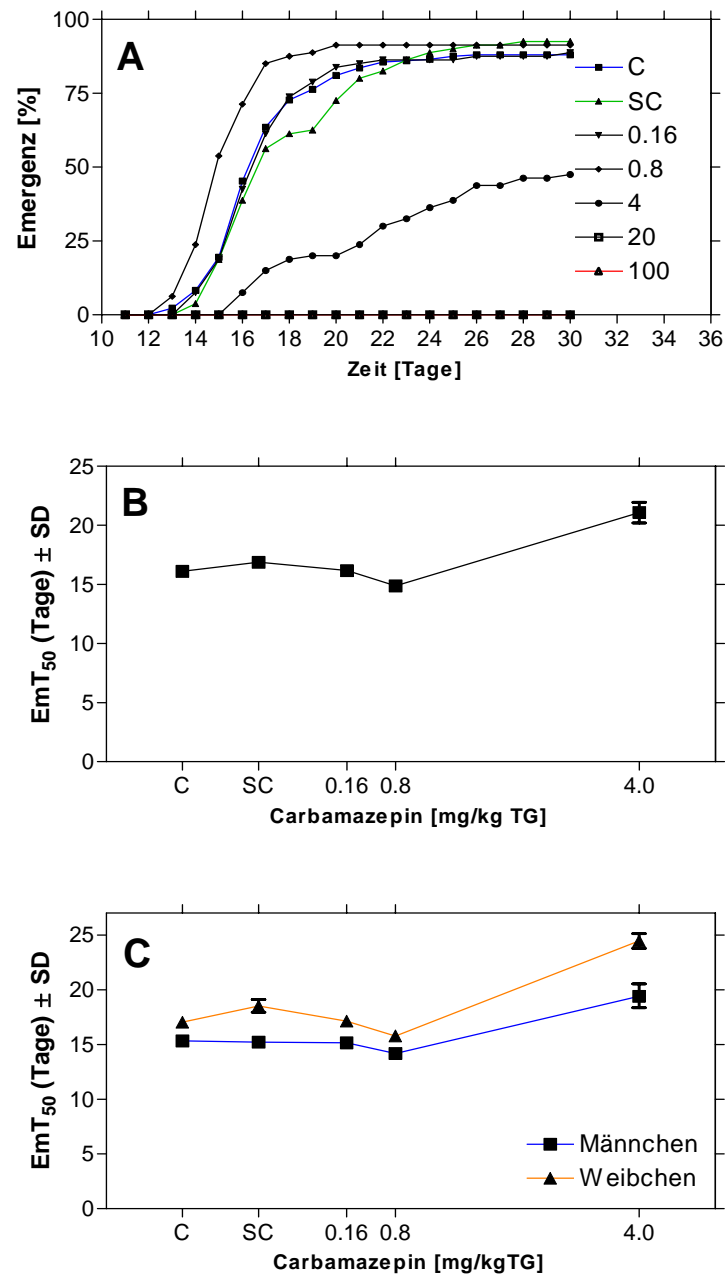
Abbildung 3.1 zeigt in Kontrolle, Lösemittelkontrolle und den Behandlungsstufen 0,16 mg/kg TG und 0,8 mg/kg TG Emergenzraten zwischen 88% und 92%. Die Abweichungen zwischen diesen Gruppen sind nicht statistisch signifikant. Ab der nächsten Behandlungsstufe, 4 mg/kg TG, ist mit einem Einbruch auf nur noch 47,5 % Emergenz erstmalig ein signifikanter Unterschied zur Lösemittelkontrolle festzustellen, in den folgenden Konzentrationen entwickeln sich keine Imagines mehr. Somit ergibt sich eine NOEC (No Observed Effect Concentration) von 0,8 mg/kg TG und eine LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) von 4 mg/kg TG. Die  $EC_{10}$  beträgt 0,07 mg/kg TG, die  $EC_{50}$  0,16 (0,13 – 0,19) mg/kg TG.

###### 2.) Schlupfverlauf, $EmT_{50}$ und Geschlechterverhältnis

Schlupfverlauf und  $EmT_{50}$  zeigen sich in ähnlicher Weise verändert wie Emergenz und Geschlechterverhältnis, wie aus den Abbildungen 3.2 A-C ersichtlich ist.

Die Parameter Schlupfverlauf und  $EmT_{50}$  unterscheiden sich in den beiden Kontrollen sowie in den ersten beiden Behandlungsstufen nicht wesentlich. In der Behandlungsstufe 4 mg Carbamazepin/kg Sediment setzt der Schlupf deutlich später ein (Abb. 3.2 A) und verläuft - im Gegensatz zu den sigmoiden Kurven der anderen Behandlungsstufen - in annähernd

linearer Form. Die  $EmT_{50}$  ist entsprechend, jedoch nicht signifikant, erhöht (Abb. 3.2 B), sie liegt mit 21,1 Tagen deutlich über der  $EmT_{50}$  der Lösemittelkontrolle, die 16,9 Tage beträgt.



**Abb. 3.2.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Carbamazepin. Serie I.

A): Schlupfverlauf

B):  $EmT_{50}$  gesamt

C):  $EmT_{50}$ , getrennt nach Männchen und Weibchen

Dieser Befund ist sowohl bei Auftragung der Gesamt-EmT<sub>50</sub> sichtbar, als auch bei getrennter Auftragung nach Männchen und Weibchen. Die EmT<sub>50</sub> verringert sich in statistisch nicht signifikanter Weise leicht in den Behandlungsstufen 0,16 und 0,8 mg/kg TG (Abb. 3.2 C). Ursache hierfür ist vor allem der geringfügig (nicht signifikant) frühere Schlupf der Weibchen. In der Behandlungsstufe 4 mg/kg TG schlüpfen Männchen und Weibchen jeweils fast vier Tage später als in der Lösemittelkontrolle.

Das Geschlechterverhältnis geht aus Tabelle 3.1 hervor:

**Tabelle 3.1.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Carbamazepin.  
Serie I. Geschlechterverhältnis

Behandlungsstufe	Anteil Männchen [% , ± SD]	Anteil Weibchen [% , ± SD]	Verhältnis m/w [± SD]
C	46,7 ± 13,2	53,2 ± 13,2	0,99 ± 0,49
SC	46,0 ± 11,5	54,0 ± 11,5	0,91 ± 0,37
0,16 mg/kg TG	48,1 ± 14,1	51,9 ± 14,1	1,04 ± 0,56
0,8 mg/kg TG	49,0 ± 8,1	51,0 ± 8,1	0,99 ± 0,29
4 mg/kg TG	68,9 ± 9,7	31,1 ± 9,6	2,45 ± 0,99

Es zeigt sich in den Behandlungsstufen C, SC, 0,16 mg/kg TG und 0,8 mg/kg TG ein nahezu ausgeglichenes Geschlechterverhältnis mit geringfügig mehr weiblichen als männlichen Tieren. Mit Einsetzen von im Einzelnen zu diskutierenden Effekten des Carbamazepins zeigt sich neben einem Einbruch in der Emergenzrate auch eine Verschiebung dieses Verhältnisses: In der Behandlungsstufe 4 mg/kg TG schlüpfen nur noch halb so viele Mücken wie in den anderen Behandlungsstufen. Vor allem schlüpfen dort nur halb so viele Weibchen wie Männchen. Die geringere Zahl an Weibchen macht 2/3 des gesamten Verlustes aus, der Rückgang bei den Männchen 1/3.

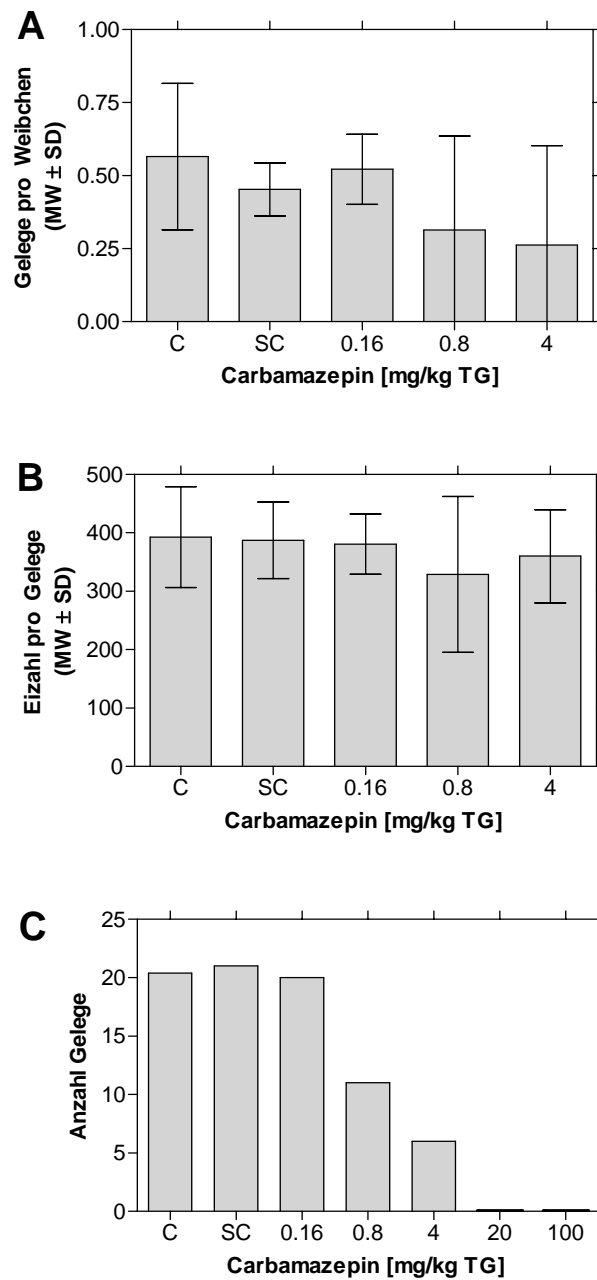
### 3.) Fekunditätsparameter

Die Tabelle 3.2 gibt die Zahl der Gelege pro Weibchen, die Eizahl pro Gelege und die durchschnittliche Anzahl der Gelege pro Behandlungsstufe wieder:

**Tabelle 3.2.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Carbamazepin.  
Serie I. Für die Gelege ermittelte Parameter

Behandlungsstufe	Gelege pro Weibchen [MW ± SD]	Eizahl pro Gelege [MW ± SD]	Gelege pro Behandlungsstufe
C	0,57 ± 0,25	393 ± 86	20,4
SC	0,45 ± 0,09	387 ± 66	21,0
0,16 mg/kg TG	0,52 ± 0,12	381 ± 52	20,0
0,8 mg/kg TG	0,31 ± 0,32	329 ± 133	11,0
4 mg/kg TG	0,26 ± 0,34	360 ± 80	6,0

Carbamazepin löst in diesem Ansatz keine Veränderungen der Zahl der Gelege pro Weibchen aus (Abb. 3.3 A). In den Kontrollen und den Behandlungsstufen 0,16 mg/kg TG sowie 0,8 mg/kg TG liegen keine Unterschiede in der durchschnittlichen Anzahl der Gelege vor. Die Behandlungsstufe 4 mg/kg TG weist eine geringere Gelegezahl auf (Tabelle 3.2). Durch die hohe Standardabweichung ist dieser Unterschied jedoch nicht signifikant.



**Abb. 3.3.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Carbamazepin. Serie I.

A): Gelege pro Weibchen

B): Zahl der Eier pro Gelege

C): Summe der Gelege pro Behandlungsstufe

One-Way-Anova bzw. Kruskal-Wallis-Test mit Dunnett- bzw. Dunn's Multiple-Comparison-Test

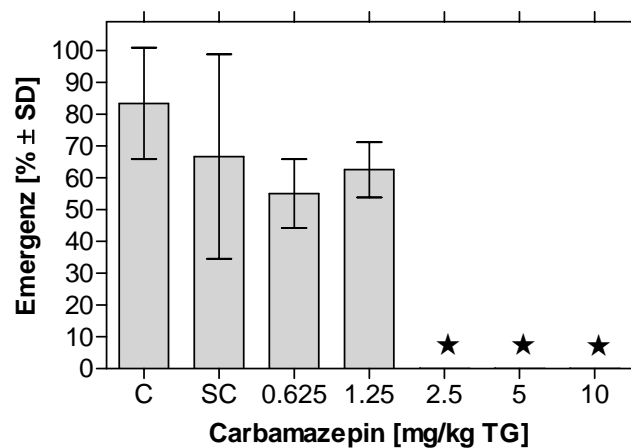
Die Eizahl pro Gelege ist statistisch nicht signifikant verschieden (Abb. 3.3 B). Bis auf die Behandlungsstufe 0,8 mg/kg TG sind die Zahlen fast gleich. In dieser Behandlungsstufe ist eine etwas geringere Eizahl anzunehmen.

Die Anzahl der Gelege ist in den Kontrollen und der ersten Behandlungsstufe kaum verschieden (Abb. 3.3 C). In der Behandlungsstufe 0,8 mg/kg zeigt sich bereits eine trotz annähernd gleicher Zahl an Weibchen deutlich verringerte Zahl an Gelegen. In der nächsthöheren Behandlungsstufe werden, bedingt durch die deutlich geringere Zahl an Mücken, nur noch sechs Gelege produziert.

## Versuchsserie II

Die Serie II wurde am 15.08.2002 begonnen. Die Konzentrationen wurden gegenüber der Serie I verringert, um den Wirkungsbereich der Substanz genauer erfassen zu können. Je 20 Larven wurden am 14., 16. und 18.09.2002 in die Versuchsgefäße eingebracht. Die längere Alterungsphase und der versetzte Einsatz wurde notwendig, da über eine längere Phase aus der Mückenzeit nicht ausreichend Eigelege entnommen werden konnten. Bei der Berechnung der  $EmT_{50}$  wurde dieser Umstand berücksichtigt.

### 1.) Emergenz



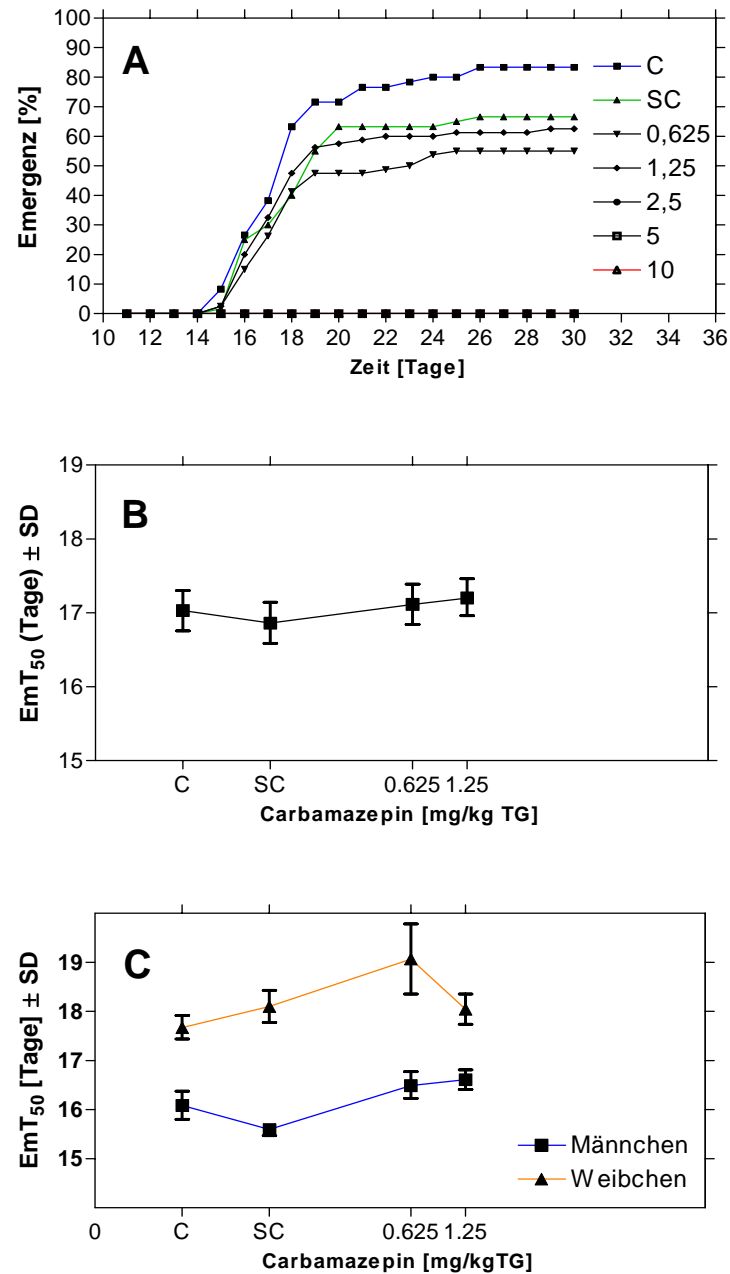
**Abb. 3.4.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Carbamazepin. Serie II, Emergenz. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple Comparison Test. ★ =  $p < 0,05$  Je 4 Replikate à 20 Larven

Die Emergenz ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Bei Kontrolle und Lösemittelkontrolle sind je ein Replikat komplett ohne Schlupf geblieben und wurden nicht in die Auswertung der Ergebnisse aufgenommen. Signifikante Differenzen zur Lösemittelkontrolle treten in allen Behandlungsstufen, in denen Mücken schlüpften, nicht auf. Auffällig sind die im Vergleich zur Serie I grundsätzlich niedrigeren Schlupfraten. Die Schlupfrate der Lösemittelkontrolle liegt lediglich bei 66,7%. Dieser Wert beruht jedoch auf dem stark abweichenden Ergebnis eines einzelnen Replikats. Ab einem Carbamazepingehalt von 2,5 mg/kg TG erfolgt kein Schlupf mehr. Somit liegt die tatsächliche LOEC für Carbamazepin niedriger als in Serie I. Die  $EC_{10}$  beträgt 0,14 mg/kg TG, die  $EC_{50}$  0,19 (0,18 – 0,21) mg/kg TG.

### 2.) Schlupfverlauf, $EmT_{50}$ und Geschlechterverhältnis

Der Schlupfverlauf weist keine Besonderheiten auf (Abb. 3.5 A). Bei allen Ansätzen, in denen Mücken schlüpfen, beginnt dies zwischen Tag 14 und 15. Alle Ansätze erreichen ihre jeweilige maximale Emergenz in nicht signifikant verschiedener Geschwindigkeit. Lediglich

mit dem Erreichen der Emergenzmaxima trennen sich die Kurven, sie verlaufen jedoch nach Erreichen des Maximums weitgehend parallel.



**Abb. 3.5.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Carbamazepin. Serie II.

A): Schlupfverlauf

B): EmT<sub>50</sub> gesamt

C): EmT<sub>50</sub>, getrennt nach Männchen und Weibchen

Auch bei der Auswertung der EmT<sub>50</sub> ergeben sich keine Auffälligkeiten (Abb. 3.5 B). Es wurden sowohl die EmT<sub>50</sub> für die Gesamtschlupfzahlen ermittelt, als auch die getrennten EmT<sub>50</sub> für Männchen und Weibchen (Abb. 3.5 C).

Betrachtet man die  $EmT_{50}$  für Männchen und Weibchen gemeinsam, so zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. In sämtlichen Ansätzen sind mit nur wenigen Stunden Unterschied 50% der Mücken am Tag 17 geschlüpft.

Bei getrennter Auftragung der  $EmT_{50}$  nach Männchen und Weibchen ergibt sich ein stärker divergierender Verlauf, der jedoch zum Teil nur aus der Skalierung resultiert. Die einzige wirklich starke, wenn auch nicht signifikante Abweichung liegt bei den Weibchen in der Behandlungsstufe 0,625 mg/kg TG, worin die Emergenzzeit um fast zwei Tage erhöht ist. Auch hier ist jedoch eine Abweichung in einem Einzelreplikat der Grund. Sämtliche anderen  $EmT_{50}$  differieren relativ zur Lösemittelkontrolle um maximal 24 h. Keiner der Unterschiede ist signifikant.

Tabelle 3.3 zeigt einen Überblick über die Geschlechterverhältnisse in den einzelnen Behandlungsstufen.

**Tabelle 3.3.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Carbamazepin. Serie II. Geschlechterverhältnis im Lebenszyklustest.

Behandlungsstufe	Anteil Männchen [%; $\pm$ SD]	Anteil Weibchen [%; $\pm$ SD]	Verhältnis m/w
C	50,3 $\pm$ 18,1	49,9 $\pm$ 18,1	1,17 $\pm$ 0,66
SC	48,1 $\pm$ 3,2	51,9 $\pm$ 3,2	0,99 $\pm$ 0,12
0,625 mg/kg TG	59,8 $\pm$ 27,0	40,2 $\pm$ 27,0	2,79 $\pm$ 2,97
1,25 mg/kg TG	59,9 $\pm$ 10,9	40,1 $\pm$ 10,9	1,68 $\pm$ 0,91

Dem praktisch ausgeglichenen Geschlechterverhältnis in den beiden Kontrollansätzen steht eine Verringerung des Weibchenanteils in den belasteten Ansätzen gegenüber. Dies ist jedoch jeweils einem niedrigen Einzelwert in je einem Replikat geschuldet. Als NOEC für den Parameter Emergenz ergibt sich somit ein Carbamazepingehalt von 1,25 mg/kg TG, als LOEC ein Gehalt von 2,5 mg/kg TG.

### 3.) Fekunditätsparameter

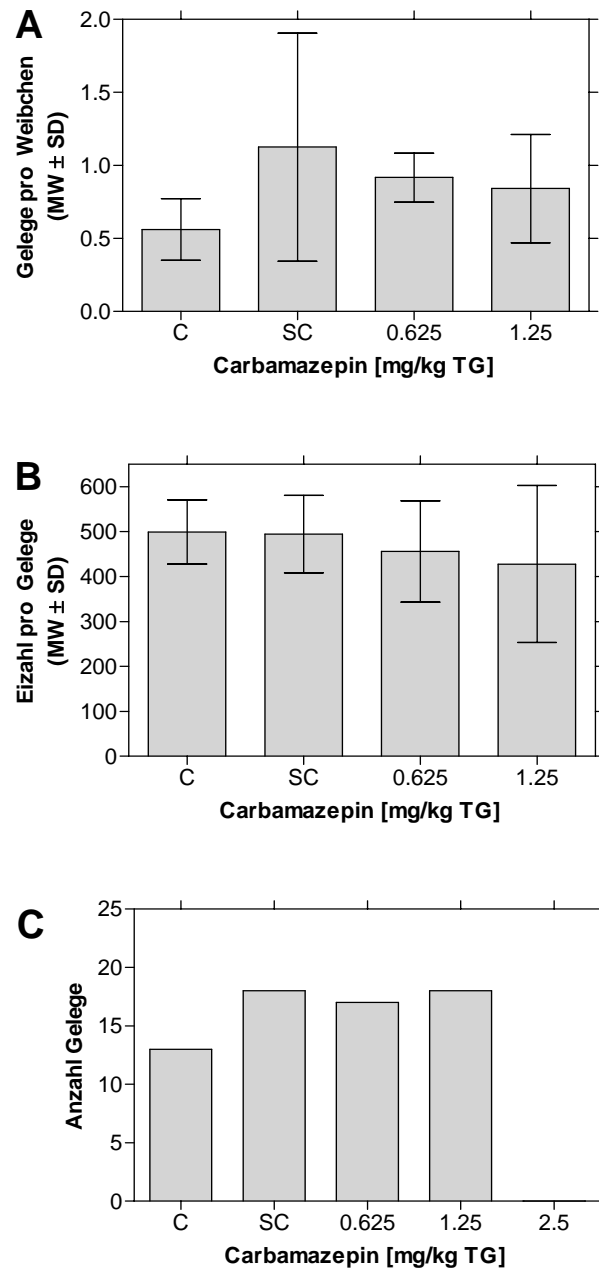
Tabelle 3.4 stellt zunächst die Zahl der Gelege pro Weibchen, die Eizahl pro Gelege und die durchschnittliche Anzahl der Gelege pro Behandlungsstufe im Überblick dar:

**Tabelle 3.4.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Carbamazepin. Serie II. Für die Gelege ermittelte Parameter

Behandlungsstufe	Gelege pro Weibchen [MW $\pm$ SD]	Eizahl pro Gelege [MW $\pm$ SD]	Gelege pro Behandlungsstufe
C	0,56 $\pm$ 0,21	499 $\pm$ 71	13
SC	1,13 $\pm$ 0,78	494 $\pm$ 86	18
0,625 mg/kg TG	0,92 $\pm$ 0,17	455 $\pm$ 117	17
1,25 mg/kg TG	0,84 $\pm$ 0,37	427 $\pm$ 175	18

Carbamazepin löst, wie auch in Serie I, keine Veränderungen der Zahl der Gelege pro Weibchen aus (Abb. 3.6 A). Die Zahl der Gelege pro Weibchen ist in der unbehandelten Kontrolle zwar im Vergleich mit den anderen Ansätzen erniedrigt, jedoch nicht signifikant reduziert. Die weiteren Behandlungsstufen unterscheiden sich nur geringfügig.





**Abb. 3.6.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Carbamazepin. Serie II.

A): Gelege pro Weibchen

B): Zahl der Eier pro Gelege

C): Summe der Gelege pro Behandlungsstufe

One-Way-Anova bzw. Kruskal-Wallis-Test mit Dunnett- bzw. Dunn's Multiple-Comparison-Test

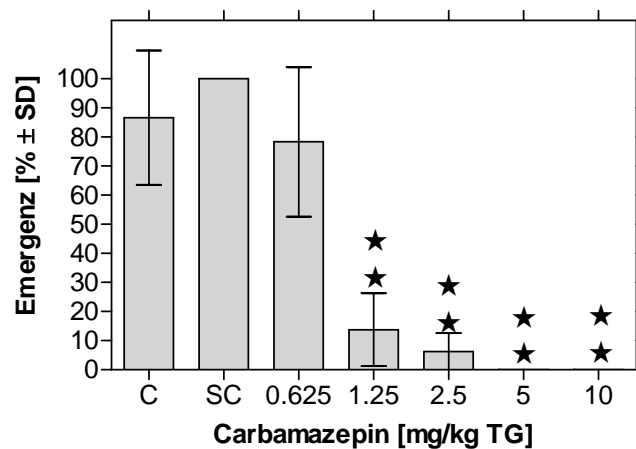
Die Zahl der Eier pro Gelege präsentiert sich mit steigender Carbamazepinkonzentration als leicht rückläufig (Abb. 3.6 B). Ein ähnliches Bild bietet sich in Versuchsserie I. Dort, wie auch hier, sind die Unterschiede jedoch statistisch nicht signifikant.

Die Summe der Gelege pro Behandlungsstufe zeigt ebenfalls keinen Effekt, der sichtlich mit Carbamazepin in Zusammenhang steht. Lediglich die Weibchen der Kontrolle, zahlenmäßig nicht weniger als in den übrigen Ansätzen, erweisen sich als weniger fruchtbar (Abb. 3.6 C). In der Lösemittelkontrolle und den mit 1,25 mg/kg TG Carbamazepin belasteten Ansätzen wurden in summa exakt gleich viele Gelege produziert, in den mit 0,625 mg/kg TG belasteten Ansätzen lediglich eines weniger.

### Versuchsserie III

Die Serie III wurde am 13.11.2002 begonnen. Je 20 Larven wurden am 25.11.2002 in die Versuchsgefäße eingebracht.

#### 1.) Emergenz



**Abb. 3.7.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Carbamazepin. Serie III. Emergenz. One-Way-Anova mit Dunnett's Multiple Comparison Test, ★ =  $p < 0,05$ ; ★★ =  $p < 0,01$ . Je 4 Replikate à 20 Larven

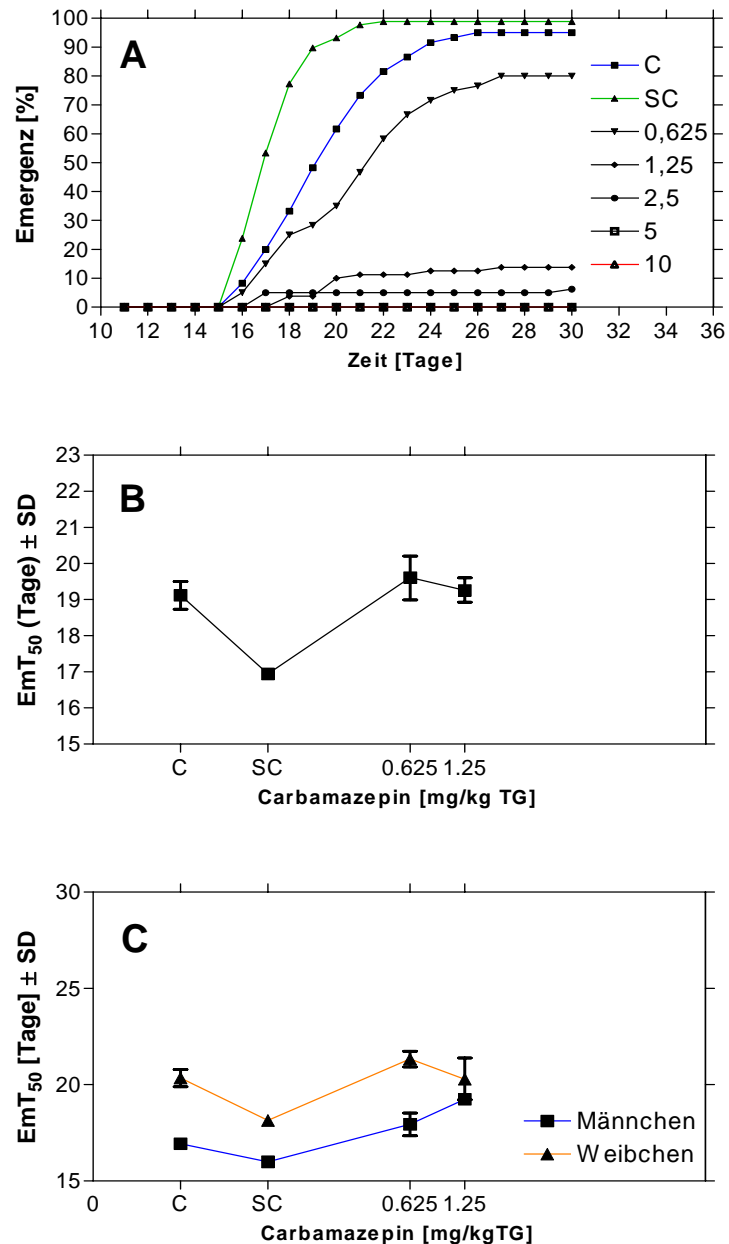
Die Emergenz ist in Abbildung 3.7 dargestellt. In der Kontrolle und in der Behandlungsstufe 0,625 mg/kg TG ist je ein Replikat komplett ohne Schlupf geblieben und wurde nicht in die Auswertung der Ergebnisse aufgenommen. Signifikante Differenzen zur Lösemittelkontrolle treten bis einschließlich zur Behandlungsstufe 0,625 mg/kg TG nicht auf. Ab der Behandlungsstufe 1,25 mg/kg TG ist die Emergenz signifikant erniedrigt, ab 5 mg/kg TG erfolgt kein Schlupf mehr. Der NOEC beträgt somit 0,625 mg/kg TG, der LOEC 1,25 mg/kg TG. Die  $EC_{10}$  beträgt 0,234 mg/kg TG, die  $EC_{50}$  0,21 (0,19 – 0,23) mg/kg TG.

#### 2.) Schlupfverlauf, $EmT_{50}$ und Geschlechterverhältnis

Der Schlupfverlauf weist, wie in den vorangegangenen Versuchsserien, keine Besonderheiten auf (Abb. 3.8 A). Bei allen Ansätzen, in denen Mücken schlüpfen, beginnt dies zwischen Tag 14 und 15. Alle Ansätze erreichen ihre jeweilige maximale Emergenz in nicht signifikant verschiedener Geschwindigkeit. In der Behandlungsstufe 0,625 mg/kg TG erfolgt die Emergenz langsamer, was sich an der flacher verlaufenden Kurve bemerkbar macht.

Betrachtet man die  $EmT_{50}$  der einzelnen Behandlungsstufen, so fällt lediglich der um drei Tage geringere Wert für die Lösemittelkontrolle auf. Sämtliche anderen Werte unterscheiden

sich nicht signifikant um maximal einen halben Tag (Abb. 3.8 B). Für die Behandlungsstufe 2,5 mg/kg konnten keine  $EmT_{50}$  berechnet werden, da zu wenige Mücken schlüpften.



**Abb. 3.8.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Tests substanz Carbamazepin. Serie III.

A): Schlupfverlauf

B):  $EmT_{50}$  gesamt

C):  $EmT_{50}$ , getrennt nach Männchen und Weibchen

Ein vergleichbares Bild bietet auch die getrennte Betrachtung der  $EmT_{50}$  für Männchen und Weibchen (Abb. 3.8 C). In der Kontrolle und in der Behandlungsstufe 0,625 mg/kg TG erfolgt der Schlupf mit vergleichbaren Abständen zwischen Männchen und Weibchen. Die einzelnen Zeiten sind ebenfalls vergleichbar. Bei der Lösemittelkontrolle macht sich der bereits in der allgemeinen Übersicht zu sehende frühere Schlupf erneut bemerkbar, auch ist der Ab-

stand zwischen Männchen und Weibchen geringer. Die beobachteten Unterschiede sind nicht signifikant.

Tabelle 3.5 gibt einen Überblick über die Geschlechterverhältnisse in den einzelnen Behandlungsstufen.

**Tabelle 3.5.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Carbamazepin.  
Serie III. Geschlechterverhältnis im Lebenszyklustest.

Behandlungsstufe	Anteil Männchen [% , $\pm$ SD]	Anteil Weibchen [% , $\pm$ SD]	Verhältnis m/w
C	35,9 $\pm$ 5,83	64,1 $\pm$ 5,83	0,57 $\pm$ 0,14
SC	54,7 $\pm$ 10,4	45,3 $\pm$ 10,4	1,30 $\pm$ 0,55
0,625 mg/kg TG	45,9 $\pm$ 19,2	54,4 $\pm$ 19,2	0,98 $\pm$ 0,60
1,25 mg/kg TG	55,6 $\pm$ 9,62	44,4 $\pm$ 9,62	1,39 $\pm$ 0,58
2,5 mg/kg TG	66,7 $\pm$ 57,7	33,3 $\pm$ 57,7	--

Aufgrund starker Schwankungen in den einzelnen Replikaten liegen in der unbehandelten Kontrolle vergleichsweise hohe Weibchenanteile vor. Die Lösemittelkontrolle und die Behandlungsstufe 1,25 mg/kg TG weisen Geschlechterverhältnisse auf, die mit den beiden vorangegangenen Versuchsserien übereinstimmen.

### 3.) Fekunditätsparameter

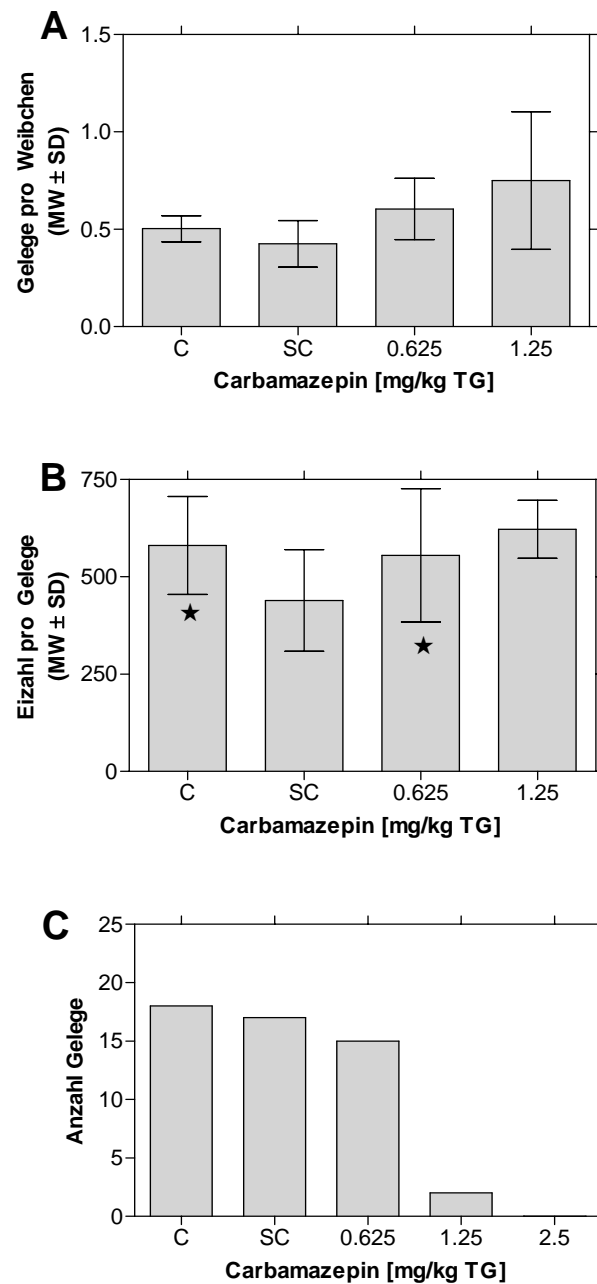
In Tabelle 3.6 sind die Zahl der Gelege pro Weibchen, die Eizahl pro Gelege und die durchschnittliche Anzahl der Gelege pro Behandlungsstufe im Überblick dargestellt:

**Tabelle 3.6.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Carbamazepin.  
Serie III. Für die Gelege ermittelte Parameter

Behandlungsstufe	Gelege pro Weibchen [MW $\pm$ SD]	Eizahl pro Gelege [MW $\pm$ SD]	Gelege pro Behandlungsstufe
C	0,50 $\pm$ 0,07	581 $\pm$ 126	18,0
SC	0,43 $\pm$ 0,12	439 $\pm$ 131	17,0
0,625 mg/kg TG	0,60 $\pm$ 0,16	555 $\pm$ 171	15,0
1,25 mg/kg TG	0,75 $\pm$ 0,35	622 $\pm$ 74	2,0

Wie in den vorangegangenen Versuchsserien weicht die Anzahl der pro Weibchen produzierten Gelege nicht signifikant voneinander ab (Abb. 3.9 A).

Die Eizahl pro Gelege in der Lösemittelkontrolle ist deutlich niedriger als in allen anderen Ansätzen (Abb. 3.9 B). Zur unbehandelten Kontrolle und zum Ansatz 1,25 mg/kg TG ergibt sich eine signifikante Differenz, die Behandlungsstufe 0,625 mg/kg TG differiert nicht signifikant. Bis auf die Lösemittelkontrolle zeigen alle Ansätze gegenüber den bisherigen Versuchsserien höhere Eizahlen.



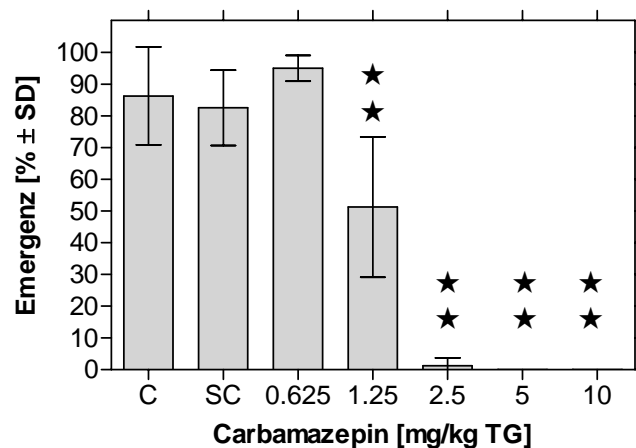
**Abb. 3.9.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Carbamazepin. Serie III.  
A): Gelege pro Weibchen  
B): Zahl der Eier pro Gelege  
C): Summe der Gelege pro Behandlungsstufe  
One-Way-Anova bzw. Kruskal-Wallis-Test mit Dunnett- bzw. Dunn's Multiple-Comparison-Test. ★ =  $p < 0,05$

In den ersten drei Ansätzen zeigen sich nur geringfügige Unterschiede in den Gelegezahlen. (Abb. 3.9 C) In der Behandlungsstufe 1,25 mg/kg TG sind nur wenige Weibchen geschlüpft, dementsprechend auch deutlich weniger Gelege vorhanden.

## Versuchsserie IV

Die Versuchsserie IV wurde am 13.09.2002 begonnen. Am 27.02.2002 wurden pro Ansatz je 20 Larven eingesetzt. Um mögliche zusätzliche Effekte einer erhöhten Temperatur zu untersuchen, wurde der Versuch bei 23 °C durchgeführt.

## 1.) Emergenz



**Abb. 3.10.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Carbamazepin. Serie IV. Emergenz One-Way-Anova mit Dunnett's Multiple Comparison Test.

★ =  $p < 0,05$ ; ★★ =  $p < 0,01$ . Je 4 Replikate à 20 Larven.

Die Emergenz weist ein den vorangegangenen Versuchsserien vergleichbares Bild auf (Abb. 3.10). Ab der Behandlungsstufe 1,25 mg/kg TG sind die Differenzen zur Lösemittelkontrolle statistisch signifikant. In den Behandlungsstufen 5 und 10 mg/kg TG erfolgt kein Schlupf mehr. Die  $EC_{10}$  beträgt 0,234 mg/kg TG, die  $EC_{50}$  0,28 (0,26 – 0,30) mg/kg TG.

2.) Schlupfverlauf,  $EmT_{50}$  und Geschlechterverhältnis

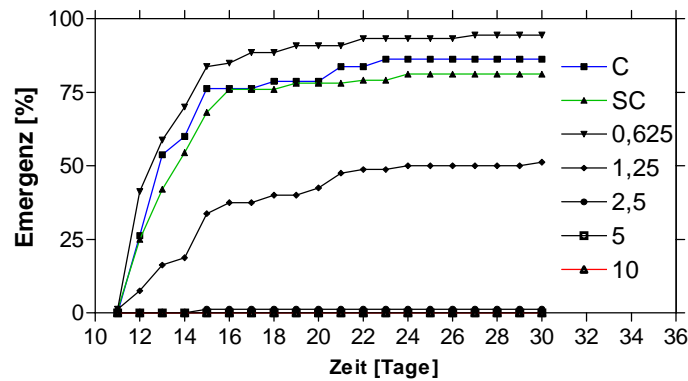
Der Schlupf setzt, verglichen mit den vorangegangenen Versuchsreihen, deutlich früher ein (Abb. 3.11 A). Bei allen Ansätzen, in denen Mücken schlüpfen, beginnt dies am Tag 11. In Kontrolle und Lösemittelkontrolle sowie der ersten Behandlungsstufe wird die jeweilige maximale Emergenz in nicht signifikant verschiedener Geschwindigkeit erreicht. In der folgenden Stufe, 1,25 mg/kg TG, zeigt die Kurve eine – nicht signifikant – geringere Schlupfgeschwindigkeit, sie verläuft deutlich flacher.

Betrachtet man in diesem Zusammenhang die  $EmT_{50}$  der einzelnen Behandlungsstufen, so spiegelt sich dieser Trend wider (Abb. 3.11 B). Die Werte der ersten drei Behandlungsstufen liegen annähernd auf einer Linie. Der Wert für die Behandlungsstufe 1,25 mg/kg TG liegt mit gut zwei zusätzlichen Tagen merklich höher.

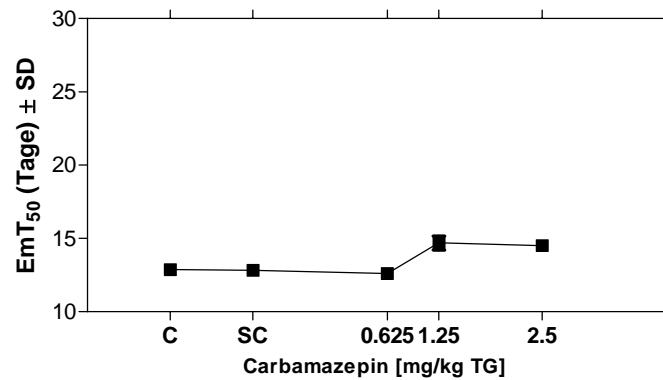
Die Betrachtung der  $EmT_{50}$  getrennt nach Männchen und Weibchen (Abb. 3.11 C) löst dies noch näher auf. Während in Kontrolle, Lösemittelkontrolle und der ersten Behandlungsstufe Männchen und Weibchen fast in gleichen Abständen schlüpfen, setzt in der Behandlungs-

stufe 1,25 mg/kg TG der Schlupf der Weibchen deutlich später ein, dies begründet auch die Verzögerung in der Gesamtemergenz.

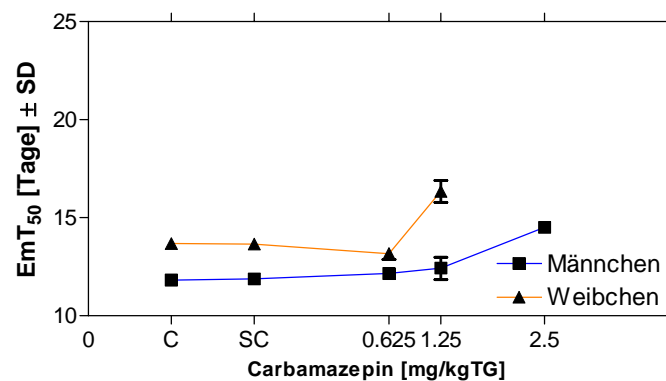
**A**



**B**



**C**



**Abb. 3.11.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Carbamazepin.

Serie IV.

A): Schlupfverlauf

B): EmT<sub>50</sub> gesamt

C): EmT<sub>50</sub>, getrennt nach Männchen und Weibchen

Das Geschlechterverhältnis ist im Wesentlichen ausgeglichen (Tab. 3.7). In der unbehandelten Kontrolle liegt ein leichter Weibchenüberschuss vor, die beiden folgenden Behandlungstufen zeigen ein völlig ausgeglichenes Geschlechterverhältnis bzw. einen leicht erhöhten

Männchenanteil. Mit der niedrigen Emergenz in der Behandlungsstufe 1,25 mg/kg geht auch ein verhältnismäßig höherer Anteil an Weibchen einher. In der Behandlungsstufe 2.5 mg/kg TG ist lediglich ein Männchen geschlüpft.

**Tabelle 3.7.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Carbamazepin. Serie IV. Geschlechterverhältnis im Lebenszyklustest

Behandlungsstufe	Anteil Männchen [%; $\pm$ SD]	Anteil Weibchen [%; $\pm$ SD]	Verhältnis m/w
C	43,7 $\pm$ 3,63	56,3 $\pm$ 3,63	0,78 $\pm$ 0,11
SC	50,8 $\pm$ 11,3	49,2 $\pm$ 11,3	1,14 $\pm$ 0,59
0,625 mg/kg TG	53,9 $\pm$ 6,95	46,1 $\pm$ 6,95	1,21 $\pm$ 0,36
1,25 mg/kg TG	37,6 $\pm$ 16,1	62,4 $\pm$ 16,1	0,67 $\pm$ 0,32
2,5 mg/kg TG	100,0 $\pm$ 0,0		

### 3.) Fekunditätsparameter

In Tabelle 3.8 sind die Zahl der Gelege pro Weibchen, die Eizahl pro Gelege und die durchschnittliche Anzahl der Gelege pro Behandlungsstufe im Überblick dargestellt.

**Tabelle 3.8.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Carbamazepin. Serie IV. Für die Gelege ermittelte Parameter

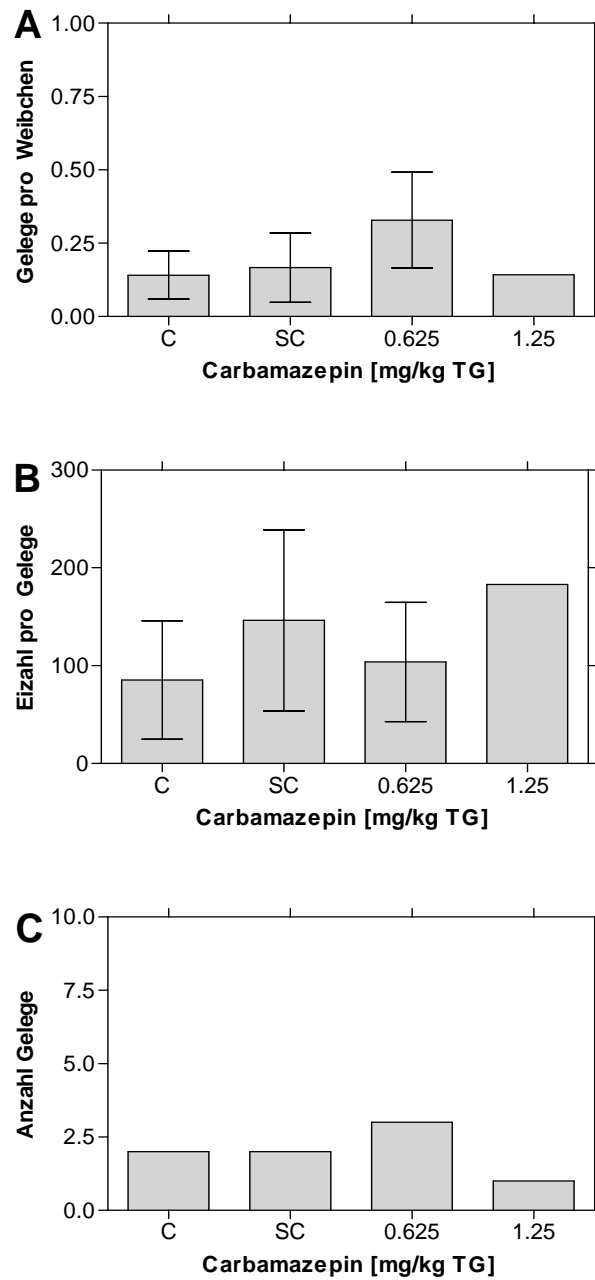
Behandlungsstufe	Gelege pro Weibchen [MW $\pm$ SD]	Eizahl pro Gelege [MW $\pm$ SD]	Gelege pro Behandlungsstufe
C	0,14 $\pm$ 0,08	85,3 $\pm$ 60,5	2
SC	0,17 $\pm$ 0,12	146 $\pm$ 92,6	2
0,625 mg/kg TG	0,33 $\pm$ 0,16	104 $\pm$ 61,0	3
1,25 mg/kg TG	0,14 $\pm$ 0,0	183 $\pm$ 0	1

Die Zahl der Gelege pro Weibchen ist deutlich geringer als in den vorangegangenen Versuchsreihen. So werden in der unbelasteten Kontrolle nur zwei Gelege produziert, obwohl insgesamt 39 Weibchen geschlüpft sind, in der Lösemittelkontrolle sind es zwei Gelege bei 33 Weibchen; ähnlich drastische Zahlen zeigen auch die anderen Behandlungsstufen. Wie zuvor jedoch weichen die Zahlen der einzelnen Behandlungsstufen nicht signifikant voneinander ab (Abb. 3.12 A).

Wie sich aus Abbildung 3.12 B ergibt, ist die Eizahl pro Gelege ebenfalls gegenüber den anderen Versuchsreihen deutlich erniedrigt. Kein Gelege enthält mehr als 260 Eier, im Vergleich zu mehr als doppelt so hohen Zahlen in den vorangegangenen Ansätzen. Aufgrund der hohen Standardabweichungen ist keiner der Werte signifikant von der Lösemittelkontrolle verschieden (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple-Comparison-Test,  $p > 0,05$ ). In der Behandlungsstufe 1,25 mg/kg TG wurde lediglich ein Gelege produziert.

Abbildung 3.12 C zeigt noch einmal den Rückgang der Fruchtbarkeit in sämtlichen Ansätzen. Nirgends werden mehr als drei Gelege produziert. Dies steht in deutlichem Gegensatz zu den vorangegangenen Versuchsreihen, in denen 15 bis 25 Gelege pro Behandlungsstufe vorlagen. Zu beachten ist, dass die Anzahl der Weibchen sich im Vergleich zu den vorigen Versuchsreihen nicht verändert hat.



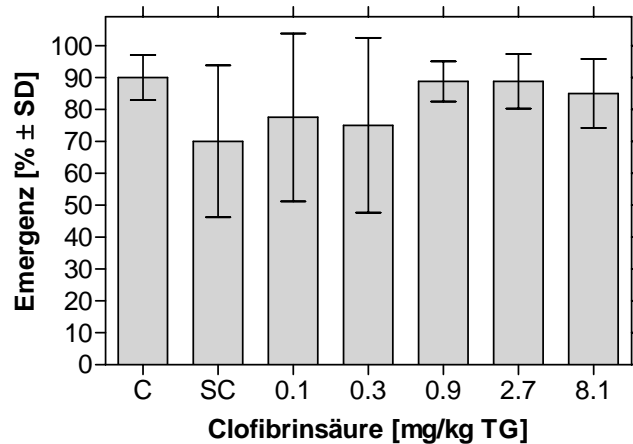


**Abb. 3.12.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Carbamazepin. Serie IV.  
A): Gelege pro Weibchen  
B): Zahl der Eier pro Gelege  
C): Summe der Gelege pro Behandlungsstufe  
One-Way-Anova bzw. Kruskal-Wallis-Test mit Dunnett- bzw. Dunn's Multiple-Comparison-Test.

### 3.1.2 Clofibrinsäure

Der Versuch wurde am 16.02.2003 mit dem Ansatz der Testsedimente begonnen. Nach zweiwöchiger Sedimentalterungsphase wurden am 01.03.2003 pro Versuchsgefäß 20 Larven eingesetzt.

#### 1.) Emergenz



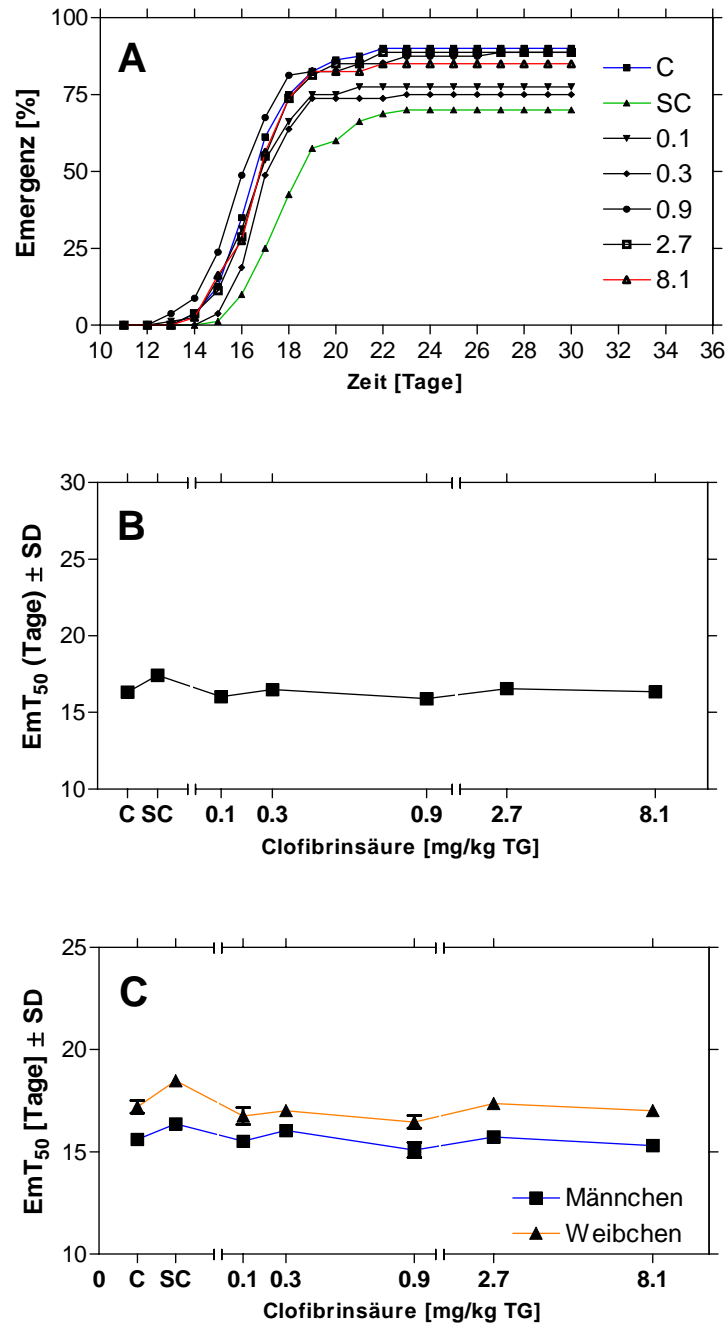
**Abb. 3.13.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Clofibrinsäure. Emergenz und Geschlechterverhältnis. Je 4 Replikate à 20 Larven.

Abbildung 3.13 stellt die Schlupferfolge in den einzelnen Behandlungsstufen dar. Mit Emergenzraten von durchgehend 70 % und mehr sind die Schlupferfolge nicht signifikant verschieden (One-Way-Anova mit Dunnett's Multiple-Comparison-Test,  $p > 0,05$ ). Auftretende hohe Standardabweichungen gehen jeweils auf stark differierende Schlupfraten in einem einzelnen Replikat zurück.

#### 2.) Schlupfverlauf, $EmT_{50}$ und Geschlechterverhältnis

Schlupfverlauf wie  $EmT_{50}$  verlaufen weitgehend gleichförmig. Die Kurven (Abb. 3.14 A-C) zeigen für die unbehandelte Kontrolle und die belasteten Ansätze einen fast identischen Schlupfverlauf. Auch die  $EmT_{50}$ , sowohl in der zusammenfassenden Berechnung als auch bei Berechnung getrennt nach Männchen und Weibchen, weichen nicht signifikant voneinander ab. Die Unterschiede betragen maximal einen Tag. Auffällig ist lediglich die Lösemittekontrolle. Die Schlupfkurve verläuft weniger steil und ist um einen Tag nach hinten verschoben. Bei Betrachtung der  $EmT_{50}$  bestätigt sich dieses Bild. Besonders auffällig ist der deutlich verzögerte Schlupf der Weibchen, der in der Summe ursächlich für die Verschiebung ist (Abb. 3.14 B, C).

Die weitere Betrachtung der  $EmT_{50}$  zeigt keine Auffälligkeiten. Aus Abbildung 3.14 B geht hervor, dass sämtliche Werte durchgehend auf einem Niveau liegen, die Unterschiede betragen kaum mehr als einen halben Tag.



**Abb. 3.14.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Tests substanz Clofibrinsäure.

A): Schlupfverlauf

B): EmT<sub>50</sub> gesamt

C): EmT<sub>50</sub>, getrennt nach Männchen und Weibchen

Dies ändert sich bei Betrachtung der EmT<sub>50</sub>, getrennt nach Männchen und Weibchen ebenso nicht. Abbildung 3.14 C zeigt, dass auch hier praktisch in allen Ansätzen Männchen und Weibchen fast zur gleichen Zeit und in fast den gleichen Abständen schlüpfen. Aus diesem Rahmen fällt lediglich die Lösemittelkontrolle heraus. Vor allem aber die Weibchen schlüpfen deutlich später als der allgemeine Durchschnitt. Für die Männchen gilt dies nur in geringem Maße. Ein leicht abweichender Trend ergibt sich auch für die Behandlungsstufe

0,3 mg/kg TG; hier schlüpfen besonders die Männchen leicht verspätet. Es zeigt sich jedoch nirgends ein signifikanter Unterschied.

Das Geschlechterverhältnis ist überwiegend ausgeglichen (Tab. 3.9). Der auffallend große Überschuss an Männchen in der Behandlungsstufe 0,1 mg/kg TG ist Folge eines Einzelereignisses: Im vierten Replikat schlüpfte lediglich ein Weibchen.

**Tabelle 3.9.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Clofibrinsäure. Geschlechterverhältnis im Lebenszyklustest

Behandlungsstufe	Anteil Männchen [% , $\pm$ SD]	Anteil Weibchen [% , $\pm$ SD]	Verhältnis m/w
C	49,0 $\pm$ 11,4	51,0 $\pm$ 11,4	1,05 $\pm$ 0,54
SC	47,2 $\pm$ 6,75	52,8 $\pm$ 6,75	0,92 $\pm$ 0,24
0,1 mg/kg TG	62,0 $\pm$ 19,6	38,0 $\pm$ 19,6	2,69 $\pm$ 2,92
0,3 mg/kg TG	51,2 $\pm$ 11,9	48,8 $\pm$ 11,9	1,12 $\pm$ 0,41
0,9 mg/kg TG	44,0 $\pm$ 10,0	56,0 $\pm$ 10,0	0,83 $\pm$ 0,35
2,7 mg/kg TG	48,6 $\pm$ 14,4	51,4 $\pm$ 14,4	1,07 $\pm$ 0,61
8,1 mg/kg TG	44,0 $\pm$ 9,14	56,0 $\pm$ 9,14	0,82 $\pm$ 0,28

### 3.) Fekunditätsparameter

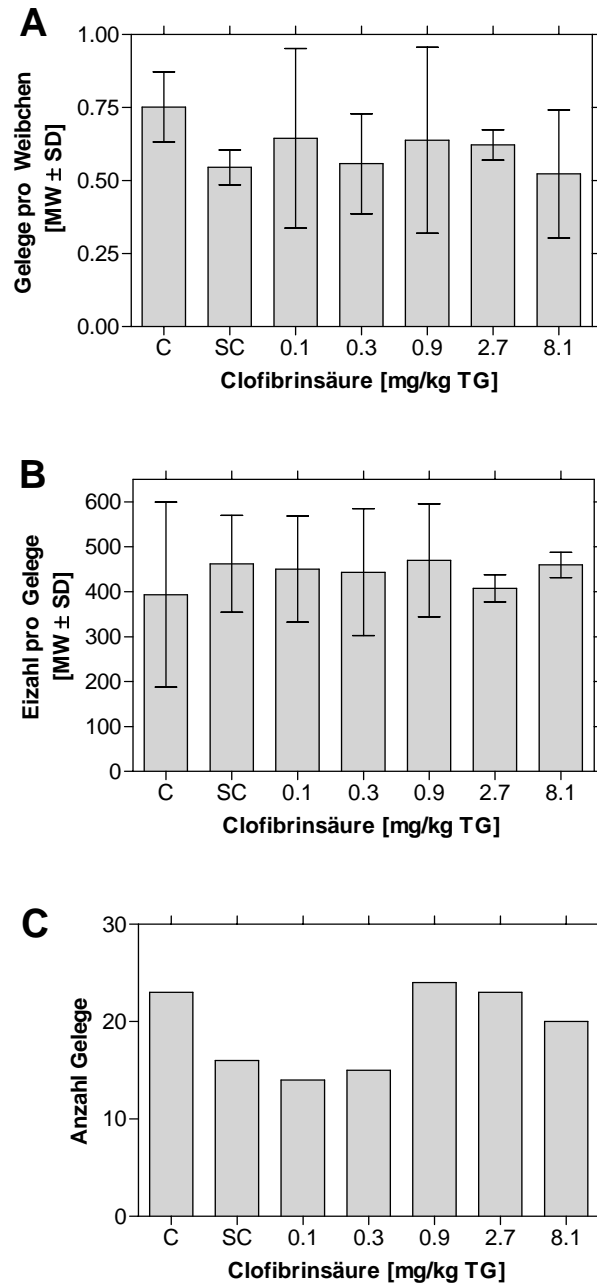
Tabelle 3.10 gibt einen Überblick über die für die Eigelege ermittelten Parameter.

**Tabelle 3.10.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Clofibrinsäure. Für die Gelege ermittelte Parameter

Behandlungsstufe	Gelege pro Weibchen [MW $\pm$ SD]	Eizahl pro Gelege [MW $\pm$ SD]	Gelege pro Behand- lungsstufe
C	0,75 $\pm$ 0,12	394 $\pm$ 206	23
SC	0,55 $\pm$ 0,06	462 $\pm$ 108	16
0,1 mg/kg TG	0,64 $\pm$ 0,31	450 $\pm$ 118	14
0,3 mg/kg TG	0,56 $\pm$ 0,17	444 $\pm$ 141	15
0,9 mg/kg TG	0,64 $\pm$ 0,32	470 $\pm$ 125	24
2,7 mg/kg TG	0,62 $\pm$ 0,05	407 $\pm$ 144	23
8,1 mg/kg TG	0,52 $\pm$ 0,22	460 $\pm$ 126	20

Die Zahl der Gelege pro Weibchen ist in Abbildung 3.15 A dargestellt. Auch wenn die Werte stark schwanken, sind doch weder untereinander noch im Vergleich zur Lösemittelkontrolle signifikante Unterschiede feststellbar. Die niedrige Zahl der Gelege pro Weibchen in der Lösemittelkontrolle resultiert aus der grundsätzlich niedrigen Emergenz in diesen Ansätzen.

Wie aus Tabelle 3.10 ersichtlich, weist lediglich die unbehandelte Kontrolle eine deutlich niedrigere durchschnittliche Eizahl pro Gelege auf. Abbildung 3.15 B zeigt, dass dieser niedrige Wert nicht statistisch signifikant von den übrigen Ansätzen differiert.



**Abb. 3.15.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Clofibrinsäure.  
 A): Gelege pro Weibchen  
 B): Zahl der Eier pro Gelege  
 C): Summe der Gelege pro Behandlungsstufe  
 One-Way-Anova bzw. Kruskal-Wallis-Test mit Dunnett- bzw. Dunn's Multiple-Comparison-Test.

In den übrigen Ansätzen wurden annähernd gleich große Gelege produziert, die sich nur um wenige Dutzend Eier unterscheiden.

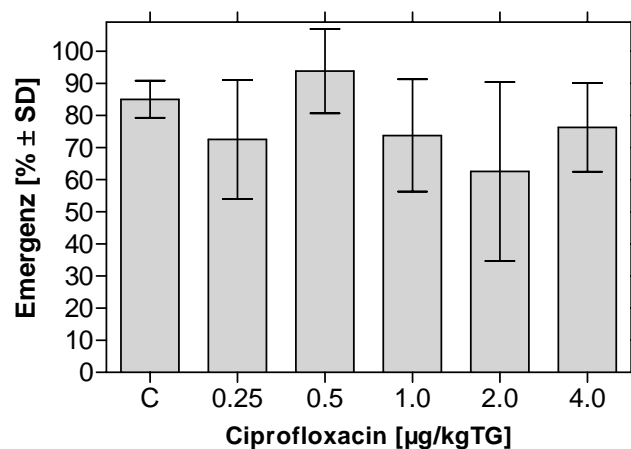
In der Lösemittelkontrolle sowie in den Ansätzen 0,1 mg/kg TG und 0,3 mg/kg TG fällt eine relativ niedrige Gesamtanzahl an Gelegen auf (Abb. 3.15 C). Diese niedrigen Anzahlen gehen einher mit dem in diesen Ansätzen ebenfalls niedrigen Weibchenanteil. Wie Abbildung 3.15 A und B zeigen, ist die Fruchtbarkeit der Weibchen in diesen Ansätzen nicht eingeschränkt.

### 3.1.3 Ciprofloxacin

Der Versuch wurde am 01.03.2004 mit dem Ansatz der Testsedimente begonnen. Aufgrund der Photolabilität von Ciprofloxacin wurde zunächst keine Versuchssubstanz zugesetzt. Am 12.03.2004 wurde das Wasser in den Ansätzen ausgetauscht, mit dem frischen Wasser wurde die entsprechende Menge Ciprofloxacin zugesetzt. Um zu gewährleisten, dass auch das Sediment mit der Versuchssubstanz in Kontakt kam, wurden Sediment und Wasser gründlich durchmischt. Nach weiteren drei Tagen Equilibationsphase wurden am 15.03.2004 pro Versuchsgefäß 20 Larven eingesetzt.

#### 1.) Emergenz

Die Emergenzraten in diesen Lebenszyklustest weichen nicht in signifikanter Weise voneinander ab (Abb. 3.16).



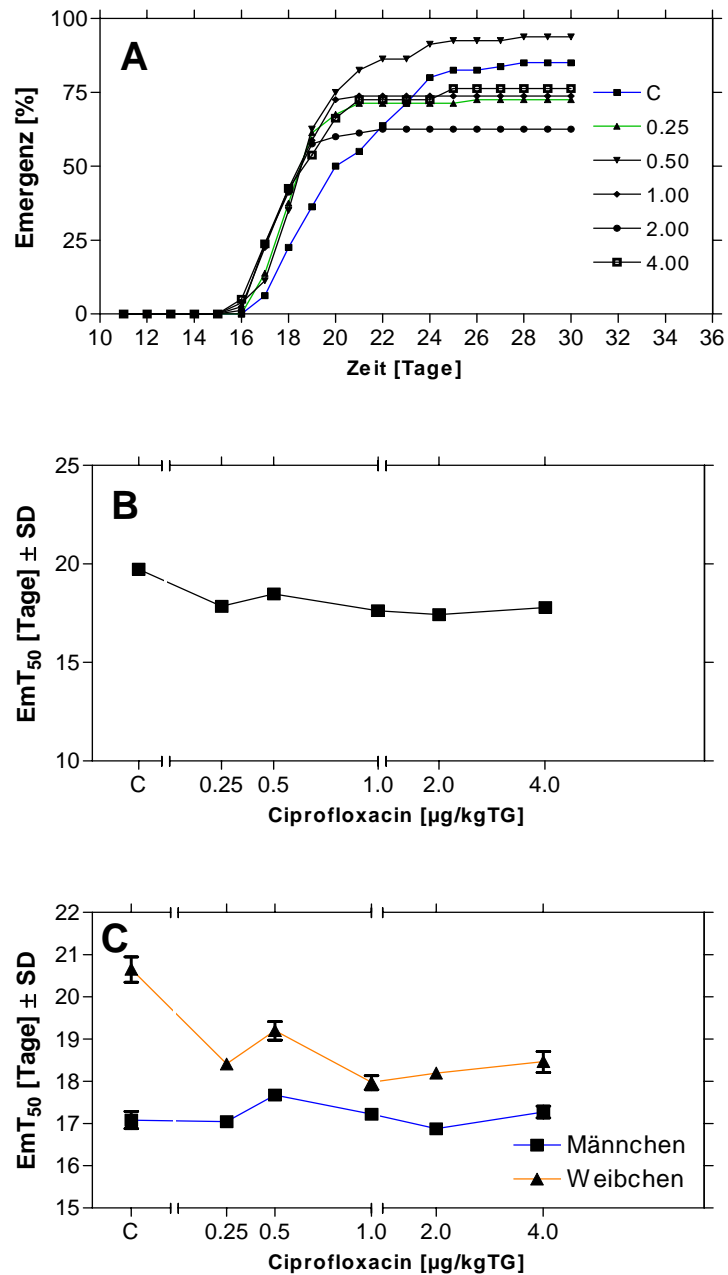
**Abb. 3.16:** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Ciprofloxacin. Emergenz. Je 4 Replikate à 20 Larven.

Lediglich die Behandlungsstufe 2,0 µg/kg TG weist mit durchschnittlich 62,5 % eine vergleichsweise niedrige Rate auf, die jedoch auf den niedrigen Schlupferfolg in einem einzelnen Replikat zurückzuführen ist. Ein signifikanter Effekt liegt, wie in den übrigen Ansätzen nicht vor (One-Way-Anova mit Dunnett's Multiple-Comparison-Test,  $p > 0,05$ ).

#### 2.) Schlupfverlauf, $EmT_{50}$ und Geschlechterverhältnis

Schlupfverlauf und  $EmT_{50}$  präsentieren sich in allen behandelten Ansätzen weitgehend identisch. Lediglich die Kontrolle weist einen langsameren Schlupfverlauf und eine erhöhte  $EmT_{50}$  auf (Abb. 3.17 A-C). In der Kontrolle und den ersten beiden Behandlungsstufen zeigt sich ein leichter Überschuss an Weibchen, während in den drei übrigen Behandlungsstufen geringfügig mehr Männchen schlüpften (Tab. 3.11). Der Unterschied beträgt jedoch in keiner der Behandlungsstufen mehr als zwei Tiere durchschnittlich.

Der Schlupfverlauf zeigt eine fast identische Entwicklung in allen belasteten Ansätzen (Abb. 3.17 A). Auffällig ist die flacher verlaufende Kurve für die Kontrolltiere. Der Schlupf beginnt zur gleichen Zeit wie in allen anderen Versuchsansätzen, jedoch tritt einen Tag später eine Verzögerung ein, die sich über den weiteren Verlauf hinzieht. Nichtsdestoweniger erreichen die Kontrollansätze die zweithöchste Schlupfrate insgesamt.



**Abb. 3.17.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Ciprofloxacin.

A): Schlupfverlauf

B): EmT<sub>50</sub> gesamt

C): EmT<sub>50</sub>, getrennt nach Männchen und Weibchen

Die Betrachtung der EmT<sub>50</sub> zeigt ein vergleichbares Resultat (Abb. 3.17 B). Die EmT<sub>50</sub> der Kontrollen liegt mit 19,7 Tagen deutlich über den weiteren Ansätzen, deren EmT<sub>50</sub> zwischen 17,4 und 18,4 Tagen liegen. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Die Betrachtung der EmT<sub>50</sub>, getrennt nach Männchen und Weibchen, liefert eine Erklärung für die vorangegangenen Befunde (Abb. 3.17 C). Bei Betrachtung der EmT<sub>50</sub>-Werte, getrennt nach Männchen und Weibchen, zeigt sich, dass die mittleren Schlupfzeiten der Männchen im Wesentlichen auf einem Niveau liegen. Es treten Unterschiede von maximal einem Tag auf. Ähnliches gilt für die Weibchen. Hier jedoch fällt der hohe Wert für die Weibchen der Kontrollen

auf; mit 20,7 Tagen liegt er deutlich höher als die anderen mittleren Emergenzzeiten. Der Wert stellt keine signifikante Abweichung dar, er erklärt jedoch die insgesamt erhöhte  $EmT_{50}$  für die Kontrolltiere. Besonders spät setzt der Schlupf der Weibchen im ersten Kontrollreplikat ein. Desgleichen liegen keine auffälligen Veränderungen im Geschlechterverhältnis vor (Tab. 3.11). Das Verhältnis Männchen/Weibchen liegt zwischen 0,78 (0,5 µg/kg TG und 1,92 (1 mg/kg TG).

**Tabelle 3.11.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Ciprofloxacin.  
Geschlechterverhältnis im Lebenszyklustest

Behandlungsstufe	Anteil Männchen [% , ± SD]	Anteil Weibchen [% , ± SD]	Verhältnis m/w
C	48,6 ± 12,5	51,4 ± 12,5	1,03 ± 0,48
0,25 µg/kg TG	42,4 ± 15,6	57,6 ± 15,6	0,84 ± 0,50
0,5 µg/kg TG	42,5 ± 9,68	57,5 ± 9,68	0,78 ± 0,30
1,0 µg/kg TG	53,8 ± 25,8	46,2 ± 25,8	1,92 ± 1,90
2,0 µg/kg TG	61,5 ± 3,61	38,5 ± 3,61	1,61 ± 0,26
4,0 µg/kg TG	57,8 ± 15,5	42,2 ± 15,5	1,64 ± 1,02

### 3.) Fekunditätsparameter

Tabelle 3.12 gibt zunächst einen Überblick über die für die Eigelege ermittelten Parameter.

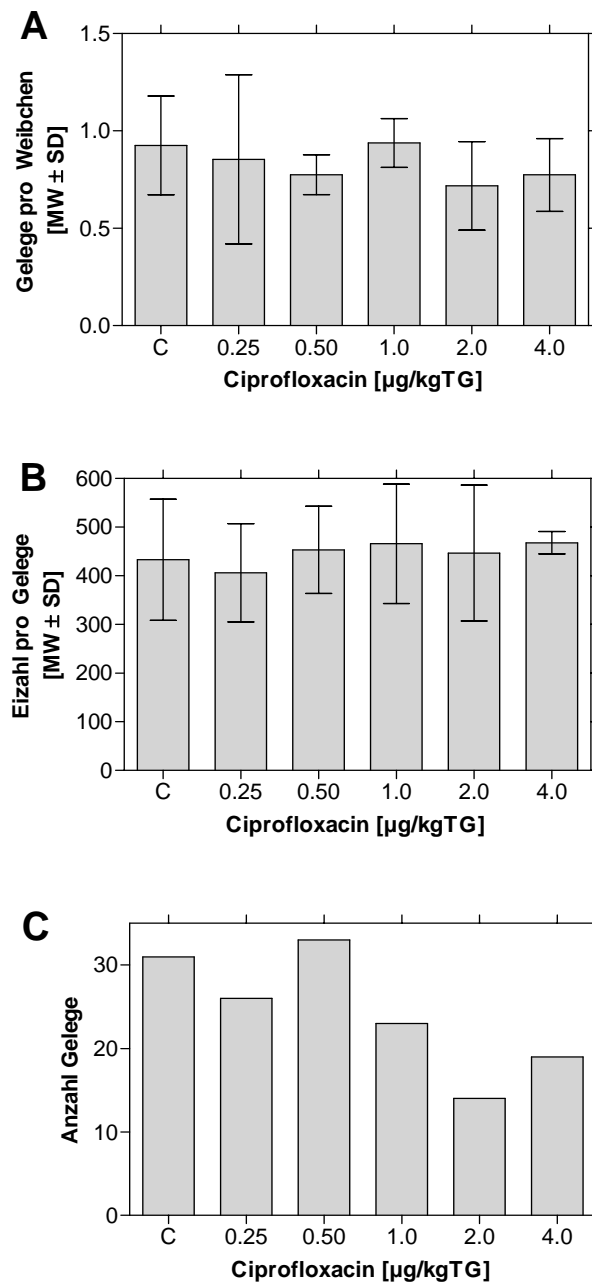
**Tabelle 3.12.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Ciprofloxacin. Für die Gelege ermittelte Parameter

Behandlungsstufe	Gelege pro Weibchen [MW ± SD]	Eizahl pro Gelege [MW ± SD]	Gelege pro Behand- lungsstufe
C	0,92 ± 0,25	433 ± 124	31
0,25 µg/kg TG	0,85 ± 0,43	406 ± 101	26
0,5 µg/kg TG	0,77 ± 0,10	453 ± 89,5	33
1,0 µg/kg TG	0,94 ± 0,13	465 ± 122	23
2,0 µg/kg TG	0,72 ± 0,23	446 ± 140	14
4,0 µg/kg TG	0,77 ± 0,19	467 ± 100	19

Die Zahl der Gelege pro Weibchen ist in Abbildung 3.18 A dargestellt. Die Zahl der Gelege pro Weibchen schwankt in den einzelnen Replikaten teilweise stark. Eine Gelegezahl pro Weibchen von 0,7 wird nirgends unterschritten, so dass insgesamt eine hohe Fruchtbarkeit vorliegt.

Die Zahlen der Eier pro Gelege weisen ebenfalls keine Besonderheit auf (Abb. 3.18 B). Bei moderaten Schwankungen zeigt sich in allen Ansätzen eine in etwa gleiche Gelegegröße. Der größte Unterschied liegt zwischen den Behandlungsstufen 0,25 µg/kg TG und 1,0 µg/kg TG vor. Hier beträgt der Unterschied durchschnittlich sechzig Eiern. Nirgends liegt jedoch ein signifikanter Unterschied vor, insbesondere nicht seitens der Kontrolle zu einem der belasteten Ansätze.





**Abb. 3.18.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Ciprofloxacin.

A): Gelege pro Weibchen

B): Zahl der Eier pro Gelege

C): Summe der Gelege pro Behandlungsstufe

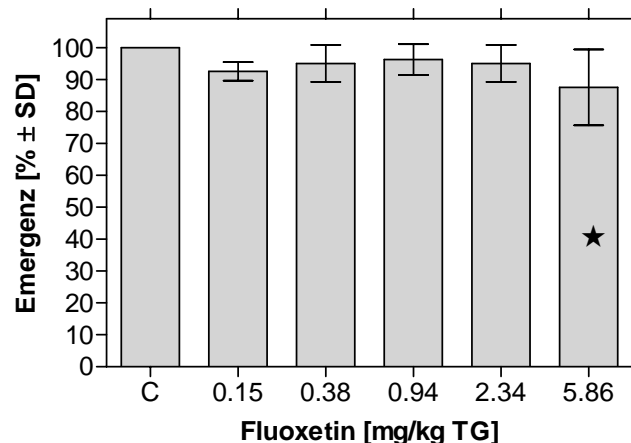
One-Way-Anova bzw. Kruskal-Wallis-Test mit Dunnett- bzw. Dunn's Multiple-Comparison-Test.

Die Zahl der Gelege pro Behandlungsstufe folgt dem Trend, der sich bereits im Geschlechterverhältnis andeutete (Abb. 3.18 C). So werden in den Behandlungsstufen 1,0  $\mu\text{g/kg TG}$ , 2,0  $\mu\text{g/kg TG}$  und 4,0  $\mu\text{g/kg TG}$  insgesamt deutlich weniger Gelege produziert. Wie bei der Darstellung der Gelege pro Weibchen zu sehen, hat jedoch die Fruchtbarkeit als solche nicht abgenommen, lediglich enthalten die Ansätze weniger Weibchen.

### 3.1.4 Fluoxetin

Die Daten wurden im Rahmen einer Diplomarbeit erhoben (HECKER 2004). Der Versuch wurde am 19.04.2004 begonnen. Nach einer zweiwöchigen Equilibrationsphase wurden 20 Larven pro Versuchsgefäß am 03.05.2004 eingesetzt.

#### 1.) Emergenz



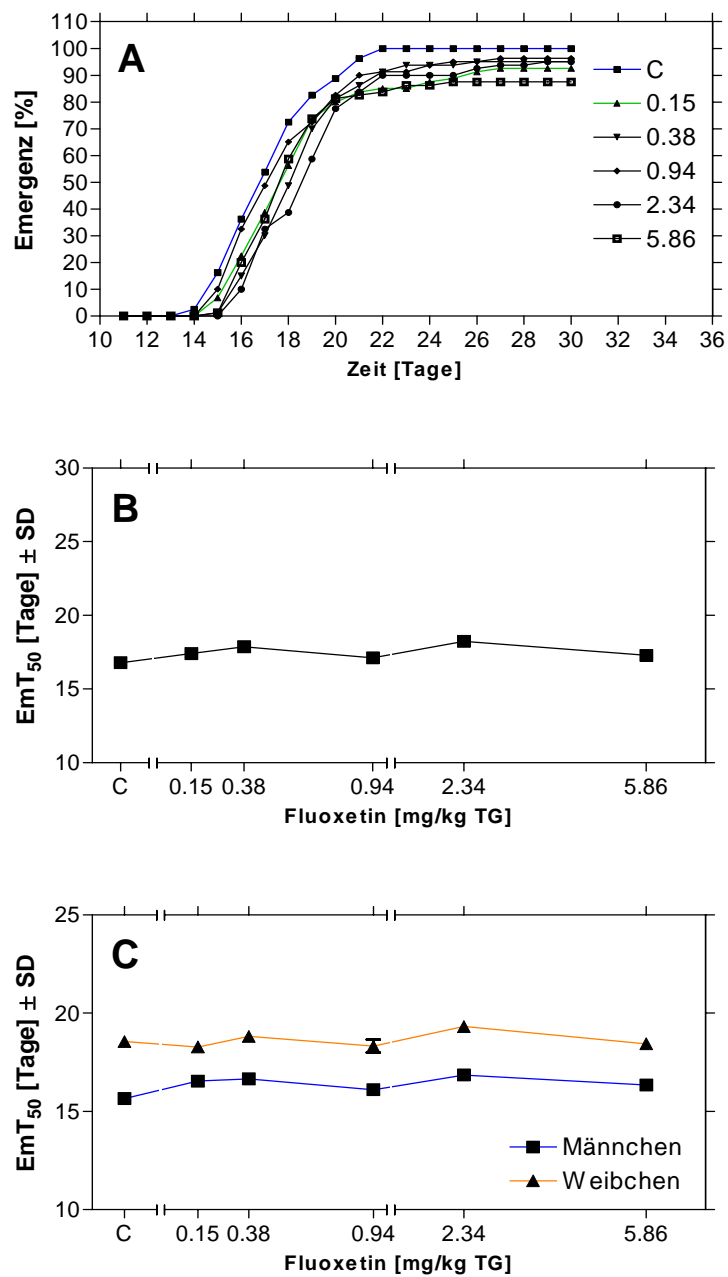
**Abb. 3.19.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Fluoxetin. Emergenz One-Way-Anova mit Dunnett's Multiple Comparison Test. ★ =  $p < 0,05$ . Je 4 Replikate à 20 Larven.

Die Emergenzraten liegen in allen Ansätzen nahe 100%. In der Kontrolle sind in allen Replikaten je 20 Tiere geschlüpft, in den belasteten Ansätzen liegen die Werte nur wenig darunter. Die mit 87,5% niedrigste Emergenzrate findet sich in der mit 5,86 mg/kg TG am stärksten belasteten Behandlungsstufe. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant.

#### 2.) Schlupfverlauf und $EmT_{50}$

Schlupfverlauf und  $EmT_{50}$  weisen keine Auffälligkeiten auf (Abb. 3.20 A-C). Die Darstellung des Schlupfverlaufs zeigt, dass der Beginn des Schlupfs zwar teilweise um einen Tag versetzt beginnt, aber mit gleicher Geschwindigkeit in allen Ansätzen vonstatten geht (Abb. 3.20 A). Signifikante Unterschiede sind nicht zu verzeichnen.

Ebenfalls keine Auffälligkeiten sind bei der  $EmT_{50}$ , berechnet für die addierten Schlupfdaten von Männchen und Weibchen, zu verzeichnen (Abb. 3.20 B). Es treten Differenzen von maximal einem Tag auf, wie auch in den Schlupfkurven zu sehen ist. Signifikante Differenzen treten nicht auf. Ein Einfluss des Fluoxetins ist nicht zu erkennen. Ein ähnliches Bild zeigt sich für die  $EmT_{50}$ , berechnet getrennt nach Männchen und Weibchen (Abb. 3.20 C). Es treten Unterschiede von maximal einem Tag auf, vergleicht man die  $EmT_{50}$  der Kontrolle und der einzelnen Behandlungsstufen. Keine dieser Differenzen ist statistisch signifikant.



**Abb. 3.20.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Fluoxetin.  
 A): Schlupfverlauf  
 B):  $EmT_{50}$  gesamt  
 C):  $EmT_{50}$ , getrennt nach Männchen und Weibchen

Die Geschlechterverhältnisse sind ebenfalls weitgehend ausgeglichen (Tab. 3.13).

**Tabelle 3.13.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Fluoxetin.  
Geschlechterverhältnis im Lebenszyklustest

Behandlungsstufe	Anteil Männchen [%; $\pm$ SD]	Anteil Weibchen [%; $\pm$ SD]	Verhältnis m/w
C	57,5 $\pm$ 9,57	42,5 $\pm$ 9,57	1,44 $\pm$ 0,51
0,15 mg/kg TG	54,0 $\pm$ 3,44	46,0 $\pm$ 3,44	1,18 $\pm$ 0,16
0,38 mg/kg TG	47,2 $\pm$ 13,4	52,8 $\pm$ 13,4	1,01 $\pm$ 0,60
0,94 mg/kg TG	54,0 $\pm$ 15,5	46,0 $\pm$ 15,5	1,36 $\pm$ 0,77
2,34 mg/kg TG	43,2 $\pm$ 7,89	56,8 $\pm$ 7,89	0,79 $\pm$ 0,29
5,86 mg/kg TG	56,3 $\pm$ 7,00	43,7 $\pm$ 7,00	1,33 $\pm$ 0,37

Bis auf die Behandlungsstufen 0,15 mg/kg TG und 2,34 mg/kg TG zeigen sich durchweg leichte Überschüsse an Männchen. Der Unterschied beträgt im Mittel jedoch maximal zwei Tiere. In der Kontrolle liegt ein ähnliches Verhältnis vor.

### 3.) Fekunditätsparameter

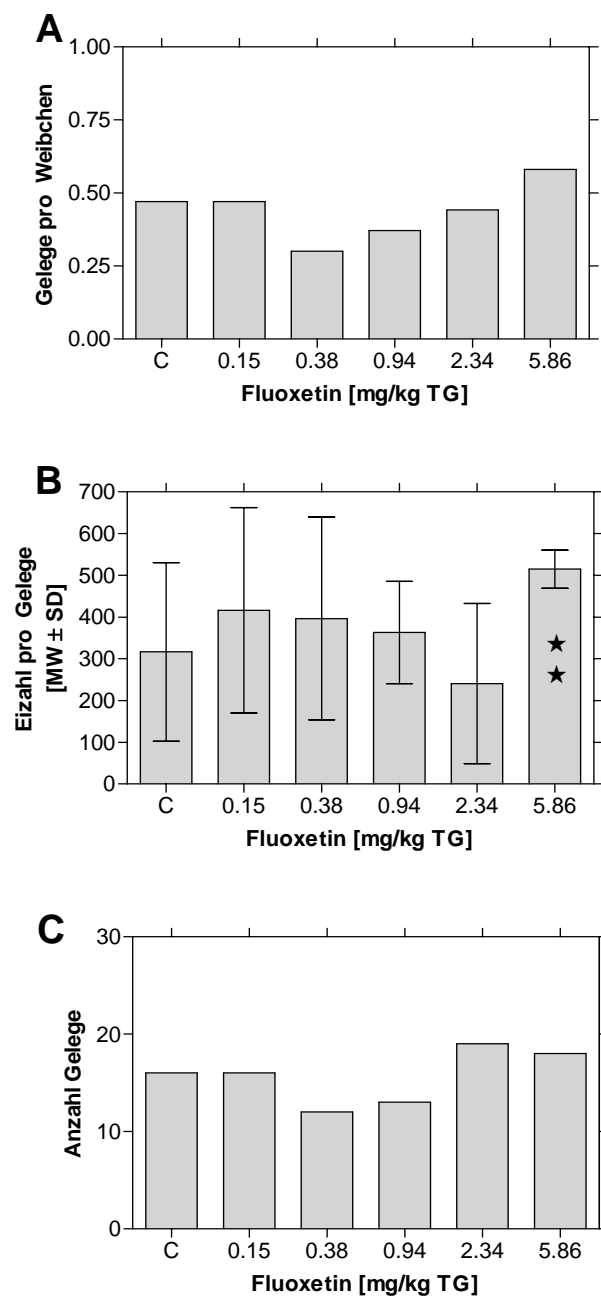
Tabelle 3.14 gibt zunächst einen Überblick über die für die Eigelege ermittelten Parameter.

**Tabelle 3.14.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Fluoxetin. Für die Gelege ermittelte Parameter

Behandlungsstufe	Gelege pro Weibchen [MW]	Eizahl pro Gelege [MW $\pm$ SD]	Gelege pro Behandlungsstufe
C	0,47	316 $\pm$ 214	16
0,15 mg/kg TG	0,47	416 $\pm$ 246	16
0,38 mg/kg TG	0,30	397 $\pm$ 243	12
0,94 mg/kg TG	0,37	363 $\pm$ 123	13
2,34 mg/kg TG	0,44	241 $\pm$ 191	19
5,86 mg/kg TG	0,58	515 $\pm$ 193	18

Die Zahl der Gelege pro Weibchen liegt, verglichen mit anderen Versuchen, relativ niedrig (Abb. 3.21 A). Eine Darstellung von Standardabweichungen in Abbildung 3.21 A ist nicht möglich, da die Gelege im Rahmen der Fragestellungen der Diplomarbeit auf Fruchtbarkeit hin untersucht werden sollten und daher kumulativ, nicht getrennt nach Replikaten erfasst wurden. In den mittleren Behandlungsstufen zeigt sich eine gegenüber der Kontrolle geringere Gelegezahl pro Weibchen, mit zunehmender Belastung steigt sie jedoch wieder an.

Die Eizahl pro Gelege schwankt, verglichen mit den vorigen Versuchen sehr stark. Abbildung 3.21 B gibt einen Überblick. Auffällig sind die hohen Standardabweichungen in den Ansätzen C, 0,15, 0,38, und 2,34 mg/kg TG. Die Kontrolle weist die zweitniedrigste Eizahl pro Gelege auf, die höchste Behandlungsstufe 5,86 mg/kg TG zeigt eine demgegenüber signifikant erhöhte Gelegezahl. Verglichen mit den anderen Versuchsreihen haben die hier produzierten Gelege eine geringe Eizahl.



**Abb. 3.21.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*, Testsubstanz Fluoxetin.

A): Gelege pro Weibchen

B): Zahl der Eier pro Gelege

C): Summe der Gelege pro Behandlungsstufe

One-Way-Anova bzw. Kruskal-Wallis-Test mit Dunnett- bzw. Dunn's Multiple-Comparison-Test. ★ =  $p < 0,05$  ★★ =  $p < 0,01$

Trotz des gegenüber den anderen Versuchsreihen erleichterten Schwarmfluges wurde kein fertiles Gelege produziert. Die gegenüber den übrigen Versuchsreihen reduzierte Fertilität schlägt sich auch in der absoluten Zahl der Gelege pro Behandlungsstufe nieder (Abb. 3.21 C). Während in vorangegangenen Versuchsreihen teilweise dreißig und mehr Gelege auftraten, liegt das Maximum hier bei 19 Gelegen. Diese Zahl bildet auch nicht die in den Behandlungsstufen 0,38 mg/kg TG und 2,34 mg/kg TG leicht erhöhten Weibchenanteile ab, sie belegt einmal mehr die in dieser Versuchsreihe reduzierte Fruchtbarkeit. Dies gilt auch für die Kontrolle.

### 3.2 *Potamopyrgus antipodarum*

Es wurden folgende Parameter erhoben:

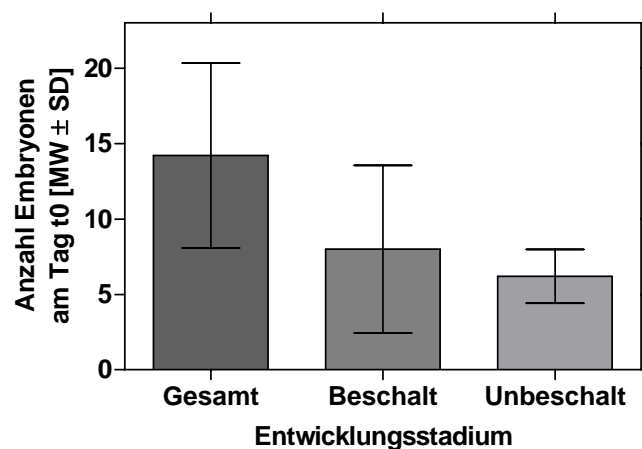
- Gesamtanzahl der Embryonen
- Anteil der beschalteten Embryonen
- Anteil der unbeschalteten Embryonen

Mit jeder der Testsubstanzen wurde eine Versuchsreihe durchgeführt.

#### 3.2.1 Carbamazepin

Der Versuch wurde am 20.11.2002 mit Einsetzen von je 80 Schnecken pro Versuchsgefäß begonnen (t<sub>0</sub>). Zur Bestimmung der Embryonenzahlen an diesem Zeitpunkt wurden 30 Tiere ausgewertet.

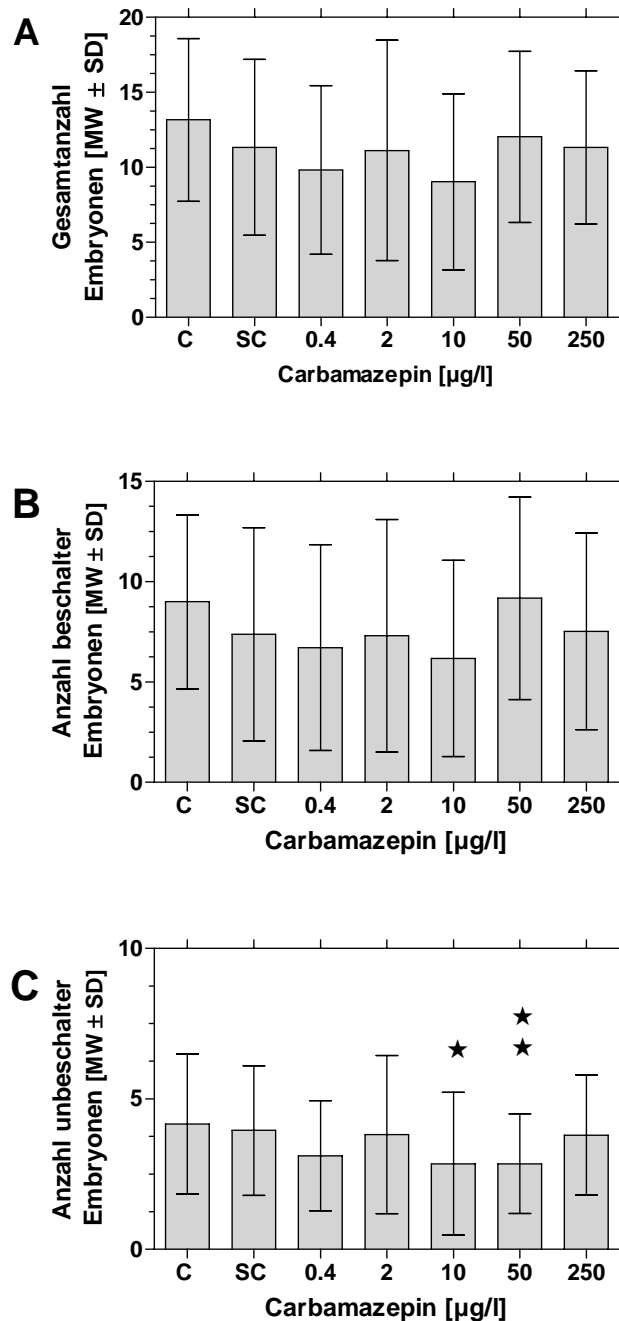
Abb. 3.22 stellt die durchschnittliche Gesamtembryonenzahl sowie die Anteile der beschalteten und unbeschalteten Embryonen dar. Laut SCHULTE-OEHLMANN (2002, PERS. MITTEILUNG) ist eine Anzahl von durchschnittlich 10-12 Embryonen ausreichend für einen Reproduktionstest; falls potentiell östrogen wirkende Substanzen getestet werden, können auch Schnecken mit weniger Embryonen eingesetzt werden. Die hier verwendeten Tiere waren somit in zufriedenstellender Verfassung (Abb. 3.22).



**Abb. 3.22.** Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*, Testsubstanz Carbamazepin. Embryonenzahlen zu Versuchsbeginn. n = 30.

- Embryonenzahlen am Versuchstag 7

Zum Zeitpunkt t7 präsentiert sich die Embryonenzahl in der Gesamtübersicht eher zufällig verteilt (Abb. 3.23 A). Signifikante Unterschiede zur Lösemittelkontrolle sind nirgends vorhanden. Hier, wie auch in der Betrachtung der Embryonen getrennt nach beschalten und unbeschalten, liegen in der unbehandelten Kontrolle die meisten Embryonen vor.



**Abb. 3.23.** Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*, Testsubstanz Carbamazepin. Auswertung t7. Je 3 Replikate à 20 Schnecken.

A): Gesamtzahl der Embryonen

B): Anzahl beschalter Embryonen

C): Anzahl unbeschalter Embryonen

Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple-Comparison-Test

★ =  $p < 0,05$ , ★★ =  $p < 0,01$

Ebenfalls in sämtlichen Ansätzen folgt anschließend ein Absinken der Embryonenzahl bis zur Behandlungsstufe 0,4 µg/l. In der Behandlungsstufe 2 µg/l ist die Embryonenzahl in allen drei Betrachtungen dann wieder etwas erhöht, jedoch niedriger als in der Kontrolle. Die Behandlungsstufe 10 µg/l weist wieder eine niedrigere Embryonenzahl auf. Die beiden folgenden Behandlungsstufen zeigen in der Gesamtübersicht und in der Betrachtung der beschalteten Embryonen abwechselnd eine erneut höhere und zuletzt eine leicht niedrigere Zahl. Nirgends liegen mehr Embryonen als in der unbehandelten Kontrolle vor.

Bei Betrachtung der unbeschalteten Embryonen zeigt sich in den Behandlungsstufen 10 und 50 µg/l eine gegenüber der Lösemittelkontrolle signifikant erniedrigte Embryonenzahl (Abb. 3.23 C). Für die Gesamtübersicht und bei den beschalteten Embryonen liegt dieser Befund nicht vor, da die hohen Standardabweichungen eine signifikante Unterscheidung nicht erlauben. Die Embryonenzahlen sind auch dort niedriger als in der Lösemittelkontrolle. Allerdings ist die Anzahl der beschalteten Embryonen nicht in so deutlichem Maße niedriger. Die Zahl der unbeschalteten Embryonen ist in den beiden signifikant unterschiedlichen Behandlungsstufen deutlich niedriger (je 2,85 im Gegensatz zu 3,95), außerdem sind die Standardabweichungen geringer.

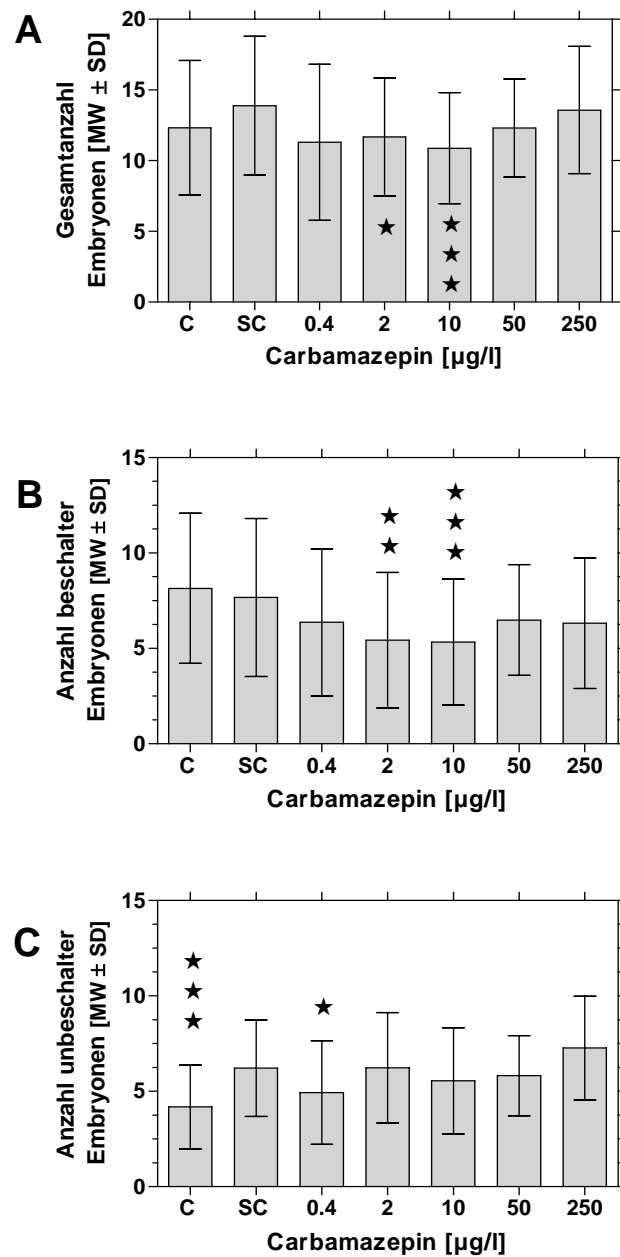
- Embryonenzahlen am Versuchstag 14

Während die Embryonenzahlen in der unbehandelten Kontrolle gegenüber der letzten Auswertung kaum verändert sind, zeigen sich in den weiteren Behandlungsstufen leichte Veränderungen. Die Behandlungsstufen 0,4 µg/l und 10 µg/l weisen gegenüber t7 höhere Embryonenzahlen auf. Trotz dieses Anstiegs sind in der Behandlungsstufe 10 µg/l sowie in der Behandlungsstufe 2 µg/l weniger Embryonen als in der Lösemittelkontrolle vorhanden. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant (Abb. 3.24 A). Ein ähnliches Bild zeigte sich bereits in der ersten Auswertung, die Standardabweichungen sind jedoch nun geringer, so dass der Unterschied statistisch untermauert werden kann. Außerdem sind nun in der Behandlungsstufe 250 µg/l mehr Embryonen vorhanden als in der Behandlungsstufe 50 µg/l. Auffällig ist eine gegenüber der Lösemittelkontrolle niedrigere Embryonenzahl in der unbehandelten Kontrolle. Der Durchschnittswert dort beträgt 12,3 Embryonen, in der Kontrolle sind es 13,9.

Die Betrachtung der beschalteten und unbeschalteten Embryonen ergibt ein gegenüber der Auswertung von t7 stark unterschiedliches Verteilungsmuster. Während bei der vorigen Auswertung die getrennte Darstellung eine der Gesamtdarstellung fast gleiche Verteilung zeigte, sind die Muster hier sichtlich verschieden. Auffällig ist, dass in der unbehandelten Kontrolle mit im Schnitt 4,2 signifikant weniger unbeschaltete Embryonen als in allen anderen Behandlungsstufen vorliegen (Abb. 3.24 C). In der Lösemittelkontrolle sind 6,2 Embryonen vorhanden, dies ist der dritthöchste Wert. Auch die Behandlungsstufe 0,4 µg/l weist signifikant weniger Embryonen als die Lösemittelkontrolle auf.

Betrachtet man die beschalteten Embryonen, zeigt sich ein abweichendes Bild (Abb. 3.24 B). In der unbehandelten Kontrolle liegen die meisten Embryonen vor, in den weiteren Behandlungsstufen sinkt die Anzahl zunächst kontinuierlich ab. In den Behandlungsstufen 50 µg/l und 250 µg/l finden sich wieder geringfügig mehr beschaltete Embryonen, jedoch weniger als in den Kontrollen. Die Behandlungsstufen 2 µg/l und 10 µg/l weisen signifikant weniger Embryonen als die Lösemittelkontrolle auf. Dies bedingt die in der Gesamtübersicht zu sehenden Unterschiede. Die gegenüber der Lösemittelkontrolle geringeren Zahlen an unbeschalteten Embryonen zeigen keinen Effekt auf die Gesamtzahl.





**Abb. 3.24.** Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*, Testsubstanz Carbamazepin. Auswertung t14. Je 3 Replikate à 20 Schnecken.

A): Gesamtzahl der Embryonen

B): Anzahl beschalter Embryonen

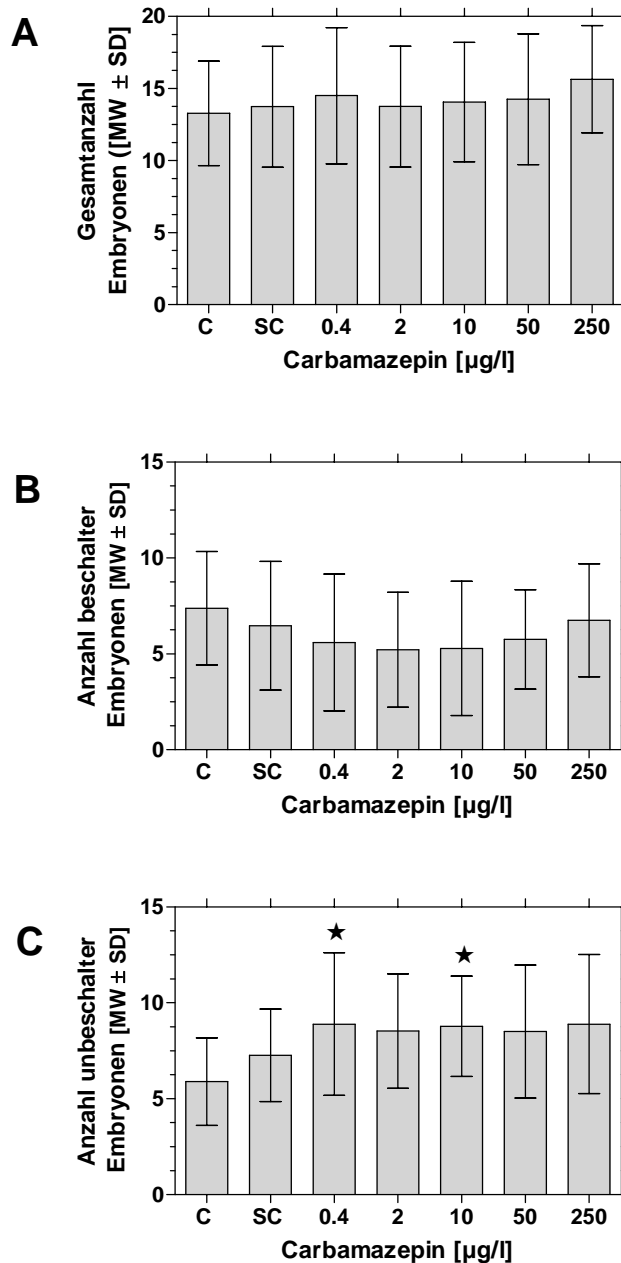
C): Anzahl unbeschalter Embryonen

Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple-Comparison-Test

★ =  $p < 0,05$ , ★★ =  $p < 0,01$ , ★★★ =  $p < 0,001$

- Embryonenzahlen am Versuchstag 21

Die Darstellung der Gesamtembryonenzahl lässt eine fast völlige Nivellierung der Verteilungsmuster erkennen (Abb. 3.25 A). In sämtlichen Ansätzen ist ein Anstieg um durchschnittlich ein bis zwei Embryonen feststellbar, lediglich die Embryonengesamtzahl der Lösemittelkontrolle verharrt auf dem Niveau der vorherigen Auswertung. Signifikante Unterschiede ergeben sich nicht.



**Abb. 3.25.** Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*, Testsubstanz Carbamazepin. Auswertung t21. Je 3 Replikate à 20 Schnecken.

A): Gesamtzahl der Embryonen

B): Anzahl beschalter Embryonen

C): Anzahl unbeschalter Embryonen

Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple-Comparison-Test

★ =  $p < 0,05$ , ★★ =  $p < 0,01$ , ★★★ =  $p < 0,001$

Die Betrachtung der Embryonen, getrennt nach beschalten und unbeschalten, zeigt, dass sich bei den beschalten Embryonen im Wesentlichen das Bild der vorigen Auswertung wiederholt (Abb. 3.25 B). Die unbehandelte Kontrolle weist die meisten Embryonen auf. Gegenüber den Behandlungsstufen 2 und 10 µg/l zeigen sich sogar signifikante Unterschiede (nicht in der Abbildung markiert, da letztlich nur zur Lösemittelkontrolle signifikante Unterschiede sicher auf einen Substanzeffekt hinweisen). Es bietet sich das gleiche Bild eines kontinuierlichen Absinkens der Anzahl beschalter Embryonen bis zur Behandlungsstufe 10 µg/l. Lediglich die beiden letzten Behandlungsstufen folgen diesem Trend nicht und weisen geringfügig mehr beschaltete Embryonen auf, jedoch nicht in signifikant unterschiedlicher Weise.

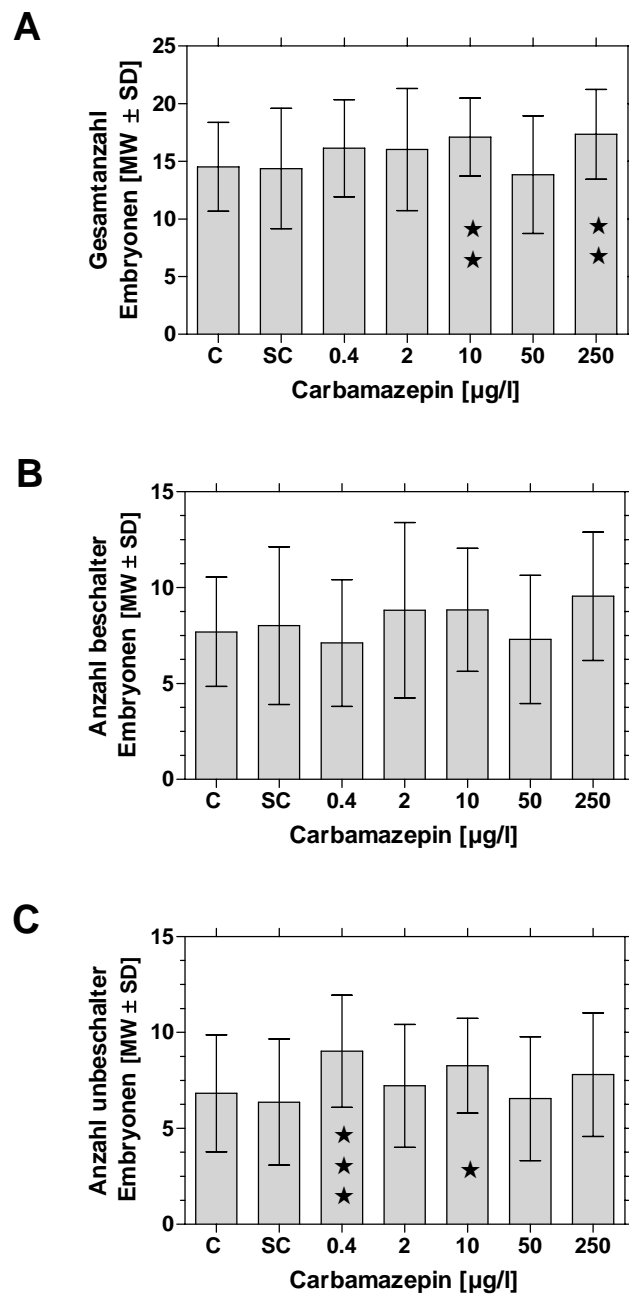
Die Zahlen der unbeschalten Embryonen zeigen ein abweichendes Bild (Abb. 3.25 C). Während die Anzahl der Embryonen in den Kontrollen durchschnittlich nur um ein beziehungsweise zwei Embryonen steigt, liegt die Zuwachsrate in den Behandlungsstufen im Schnitt bei bis zu drei Embryonen. Dies führt dazu, dass die Embryonenzahl in den behandelten Ansätzen im Gesamtbild deutlich zunimmt. Die Nivellierung in der Gesamtzahl und ein sichtbarer leichter Embryonenüberschuss in den behandelten Ansätzen ist somit auf diesen Sprung bei den unbeschalten Embryonen zurückzuführen. Die Behandlungsstufen 0,4 µg/l und 10 µg/l zeigen signifikant erhöhte Embryonenzahlen. Dies ist für die Behandlungsstufe 0,4 µg/l besonders bemerkenswert, da die Embryonenzahlen dort in der vorherigen Auswertung gegenüber der Lösemittelkontrolle noch signifikant erniedrigt waren.

- Embryonenzahlen am Versuchstag 28

Vereinzelt zeigen sich hier statistisch signifikante Differenzen zur Lösemittelkontrolle, die jedoch keinem Trend folgen. Eine Dosis-Wirkungs-Beziehung ist nicht erkennbar, zumal die signifikante Differenz der Behandlungsstufe 250 µg/l zur Lösemittelkontrolle sich nur in der Summe ergibt, nicht jedoch bei getrennter Betrachtung der beschalten und unbeschalten Embryonen.

Hier zeigt sich folgendes Bild: Die Zahlen der beschalten Embryonen liegen annähernd auf gleichem Niveau. Signifikante Differenzen zur Lösemittel- oder zur unbehandelten Kontrolle ergeben sich nicht. Der Trend vorangegangener Auswertungen findet sich jedoch nicht mehr; ein Absinken der Embryonenzahl in der Lösemittelkontrolle und den ersten drei Carbamazepinansätzen gegenüber der unbehandelten Kontrolle liegt nicht vor. Vielmehr liegen Kontrolle und Lösemittelkontrolle praktisch gleichauf; die Behandlungsstufen 0,4 und 50 µg/l weisen eine leicht geringere, die übrigen Behandlungsstufen eine leicht höhere Embryonenzahl auf. Keiner dieser Werte ist jedoch statistisch von der Lösemittelkontrolle zu trennen.

Die Betrachtung der unbeschalten Embryonen liefert ein von der vorherigen Auswertung abweichendes Bild. Zunahmen der Embryonenzahlen betragen überall durchschnittlich nur einen Embryo, in den Behandlungsstufen 2 und 50 µg/l ist die Zahl unbeschalteter Embryonen gegenüber der Auswertung an t21 gesunken. Bedeutend sind lediglich die Unterschiede in den Behandlungsstufen 0,4 und 10 µg/l, wo durchschnittlich drei Embryonen mehr als in der Lösemittelkontrolle vorliegen. Die höchste Behandlungsstufe, weist keine signifikante Differenz zur Lösemittelkontrolle auf.



**Abb. 3.26.** Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*, Testsubstanz Carbamazepin. Auswertung t28. Je 3 Replikate à 20 Schnecken.

A): Gesamtzahl der Embryonen

B): Anzahl beschalter Embryonen

C): Anzahl unbeschalter Embryonen

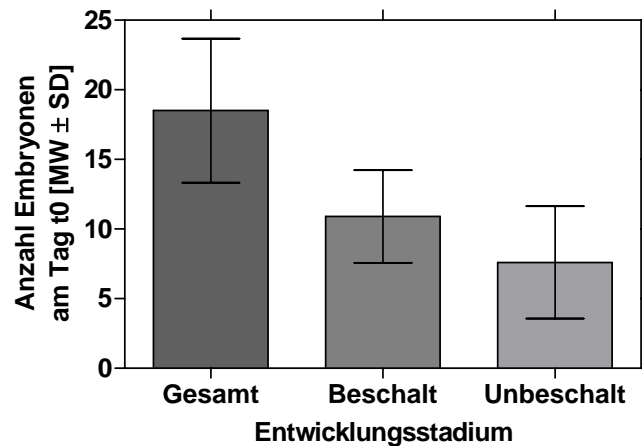
Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple-Comparison-Test

★ =  $p < 0,05$ , ★★ =  $p < 0,01$ , ★★★ =  $p < 0,001$

Letztlich zeigt sich in allen Behandelungsstufen, in denen die Zahl unbeschalter Embryonen wächst, dieselbe Zuwachsrate. Die signifikante Erhöhung der Embryonenzahl in der höchsten Behandelungsstufe erscheint als Produkt des Embryonenschubs in der dritten Versuchswoche.

## 3.2.2 Clofibrinsäure

Der Versuch wurde am 20.01.2003 mit Einsetzen von je 60 Schnecken pro Versuchsgefäß begonnen ( $t_0$ ). Zur Bestimmung der Embryonenzahlen an diesem Zeitpunkt wurden 20 Tiere ausgewertet (Abb. 3.27).



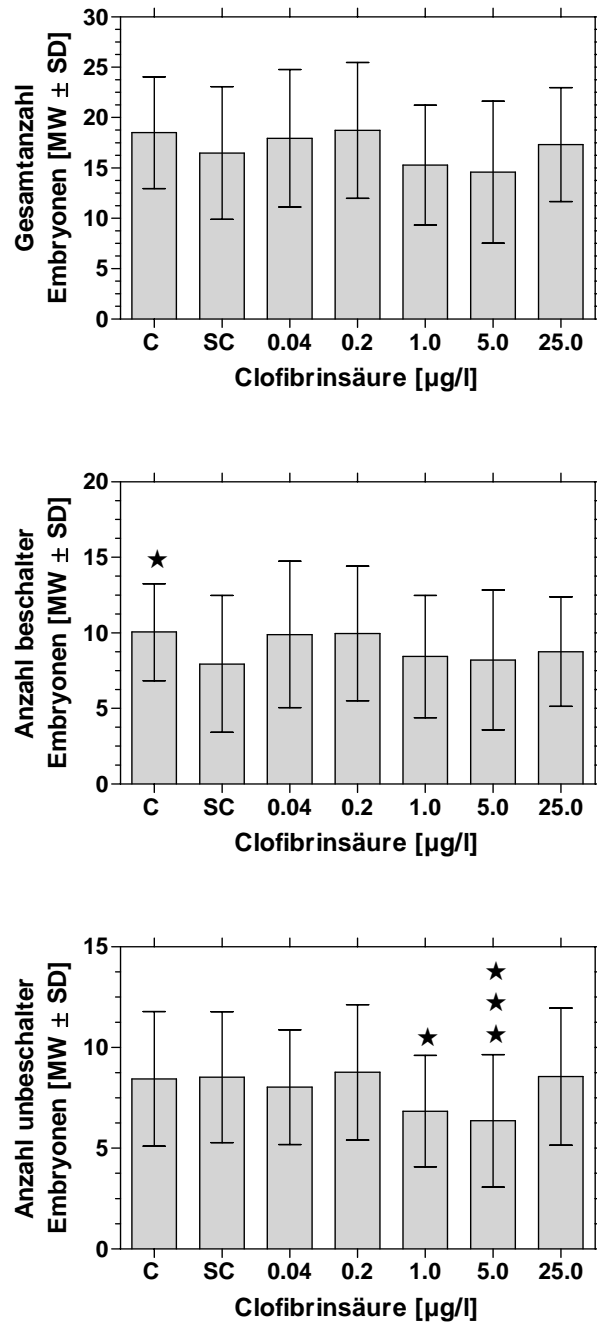
**Abb. 3.27:** Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*, Testsubstanz Clofibrinsäure. Embryonenzahlen zu Versuchsbeginn.  $n = 30$ .

Mit einer durchschnittlichen Embryonengesamtzahl von 18,5 beziehungsweise im Schnitt 10,9 beschalteten und 7,6 unbeschalteten Embryonen befinden sich die Tiere zu Versuchsbeginn in guter Kondition (Abb. 3.27). Vorschäden liegen nicht vor.

- Embryonenzahlen am Versuchstag 14

Die Verteilungsmuster der Embryonenzahlen lassen keinen signifikanten Unterschied erkennen (Abb. 3.28 A). Mit durchschnittlich 15,3 und 14,6 Embryonen weisen die Behandlungsstufen 1,0 und 5,0  $\mu\text{g/l}$  die niedrigsten Embryonenzahlen auf, doch keiner dieser Werte ist signifikant verschieden zur Lösemittelkontrolle. Auffällig ist, dass diese mit durchschnittlich 16,5 Embryonen den drittniedrigsten Wert aufweist, die unbehandelte Kontrolle und die Behandlungsstufen 0,04, 0,2 und 25  $\mu\text{g/l}$  haben höhere Embryonenzahlen. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die vorliegenden Schwankungen zufällig erscheinen. Die Differenzen in den Embryonenzahlen betragen maximal 4 Embryonen, ein signifikanter Unterschied tritt nicht auf.

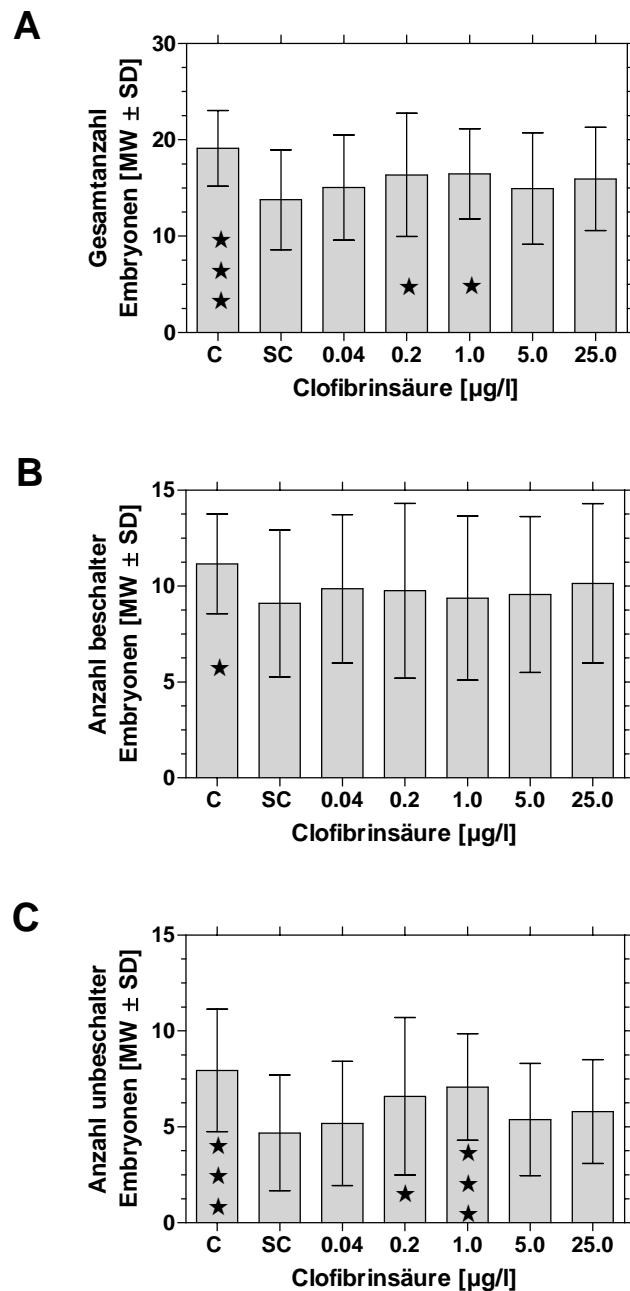
Betrachtet man die Embryonenzahlen getrennt nach beschalteten und unbeschalteten Embryonen, so zeigt sich nur für die beschalteten Embryonen ein der Gesamtübersicht vergleichbares Bild (Abb. 3.28 B). Hier weist allerdings die Lösemittelkontrolle mit 7,95 Embryonen den niedrigsten Wert auf. Die Tiere in der unbehandelten Kontrolle haben durchschnittlich 10,1 Embryonen. Dieser Wert ist signifikant höher als in der Lösemittelkontrolle. Hier, wie auch bei den unbeschalteten Embryonen, ist die leicht verringerte Anzahl bei den Behandlungsstufen 1,0 und 5,0  $\mu\text{g/l}$  zu erkennen.



**Abb. 3.28.** Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*, Testsubstanz Clofibrinsäure. Auswertung t14. Je 3 Replikate à 20 Schnecken.  
A): Gesamtzahl der Embryonen  
B): Anzahl beschalter Embryonen  
C): Anzahl unbeschalter Embryonen  
Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple-Comparison-Test  
★ =  $p < 0,05$ , ★★ =  $p < 0,01$ , ★★★ =  $p < 0,001$

Diese Unterschiede sind bei Betrachtung der unbeschalten Embryonen jedoch signifikant, da die Lösemittelkontrolle mit 8,53 Embryonen im Gegensatz zum Gesamtbild den dritthöchsten Wert aufweist (Abb. 3.28 C). Somit trennen sich im statistischen Vergleich die Werte von 6,85 und 6,37 in den Behandlungsstufen 1,0 und 5,0 µg/l von den übrigen Werten ab. Die höchste Behandlungsstufe 25,0 µg/l weist den zweithöchsten Embryonenwert auf und ist, wie die übrigen Ansätze, nicht von der Lösemittelkontrolle zu unterscheiden.

- Embryonenzahlen am Versuchstag 28



**Abb. 3.29.** Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*, Testsubstanz Clofibrinsäure. Auswertung t28. Je 3 Replikate à 20 Schnecken.  
A): Gesamtzahl der Embryonen  
B): Anzahl beschalter Embryonen  
C): Anzahl unbeschalter Embryonen  
Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple-Comparison-Test  
★ =  $p < 0,05$ , ★ ★ ★ =  $p < 0,001$

Mit durchschnittlich 13,8 Embryonen weist die Lösemittelkontrolle den niedrigsten Wert aller Ansätze auf, mehr als fünf weniger als die unbehandelte Kontrolle (Abb. 3.29 A). Dieser

Unterschied ist hoch signifikant (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple-Comparison-Test,  $p < 0,001$ ). Obwohl die Tiere in den weiteren Ansätze ebenfalls drei bis fünf Embryonen weniger als die Kontrollschnecken tragen, finden sich aufgrund der Standardabweichungen keine weiteren signifikanten Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle. Es zeigt sich somit ein deutlicher Unterschied zwischen den ethanolbehandelten Ansätzen einerseits und der unbehandelten Kontrolle andererseits. Innerhalb der ethanolhaltigen Ansätze zeigen sich außerdem Unterschiede zwischen der Lösemittelkontrolle und den Behandlungsstufen 0,2 und 1,0  $\mu\text{g/l}$ .

Die Betrachtung der Embryonen, getrennt nach beschalten und unbeschalten, bestätigt den Eindruck der Gesamtübersicht im Wesentlichen. Innerhalb der beschalten Embryonen fallen die Unterschiede nicht so deutlich aus wie im Gesamtbild (Abb. 3.29 B), doch auch hier setzt sich die unbehandelte Kontrolle mit im Schnitt 11,2 um ein bis zwei Embryonen von allen anderen Ansätzen ab; dies ist ein gegenüber der Lösemittelkontrolle statistisch signifikanter Unterschied. Die ethanolhaltigen Ansätze zeigen mit neun bis maximal zehn Embryonen etwa gleiche Zahlen, signifikante Unterschiede liegen nicht vor. Es bestätigt sich jedoch der Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrolle und den weiteren Ansätzen.

Dieser wird bei den unbeschalten Embryonen noch deutlicher (Abb. 3.29 C). Zwar liegt die Behandlungsstufe 1,0  $\mu\text{g/l}$  mit 7,08 Embryonen noch recht nahe an der unbehandelten Kontrolle (7,95 Embryonen), doch die Lösemittelkontrolle weist mit 4,68 Embryonen einen signifikant niedrigeren Wert auf. Die weiteren Ansätze zeigen ebenfalls Embryonenzahlen, die gegenüber der Lösemittelkontrolle um ein bis zwei Embryonen erhöht sind; die Behandlungsstufe 0,2  $\mu\text{g/l}$  ist mit  $p < 0,05$  signifikant verschieden. Die Erniedrigung der Embryonenzahl betrifft sämtliche lösemittelbehandelten Ansätze, so dass diese Werte eine Folge der beobachteten Infektion zu sein scheinen.

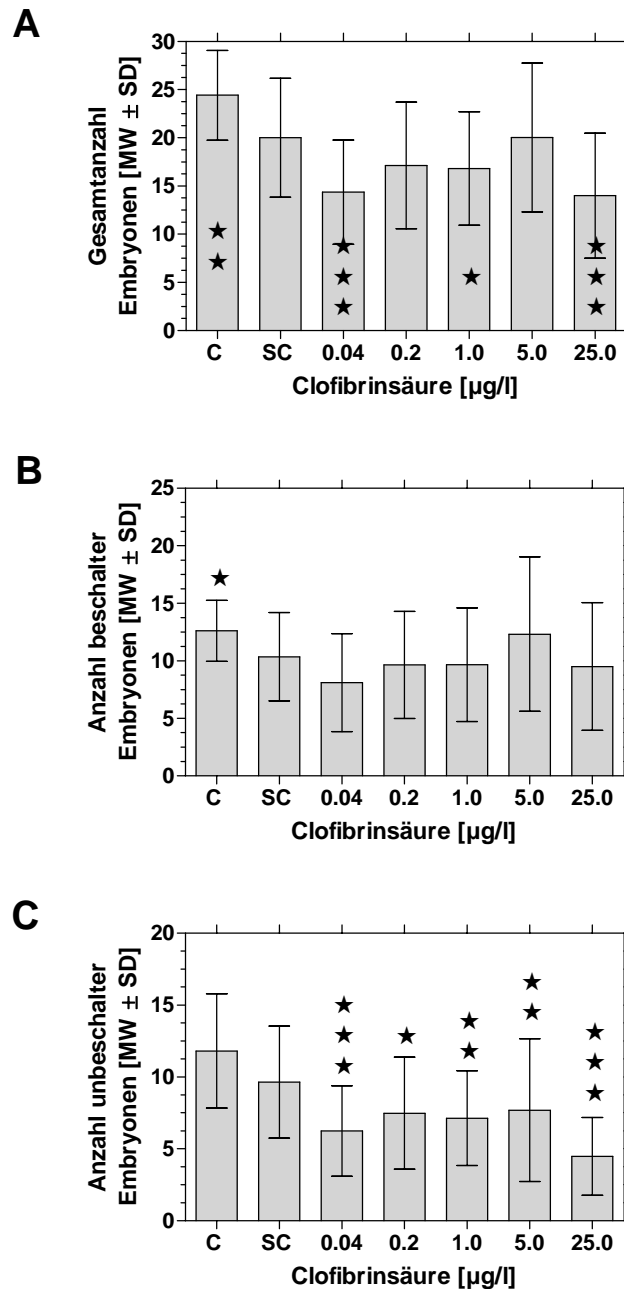
- Embryonenzahlen am Versuchstag 56

Es bestätigt sich erneut der Unterschied zwischen lösemittelbehandelten Ansätzen und der unbehandelten Kontrolle (Abb. 3.30 A). Diese ist zu allen anderen Ansätzen signifikant verschieden (in der Abbildung nicht extra markiert). Die behandelten Ansätze bieten ein uneinheitliches Bild, die Behandlungsstufen 0,04  $\mu\text{g/l}$  und 25  $\mu\text{g/l}$  sind signifikant von der Lösemittelkontrolle verschieden, die übrigen Behandlungsstufen nicht. Mit im Mittel 20 Embryonen liegt die Lösemittelkontrolle auf dem Niveau der Behandlungsstufe 5,0  $\mu\text{g/l}$ . Den höchsten Wert weist erneut die unbehandelte Kontrolle mit 24,4 Embryonen auf, auch dies ist signifikant verschieden zur Lösemittelkontrolle. Das Verteilungsmuster der Embryonenzahlen (nur geringe Unterschiede in den Behandlungsstufen 0,2  $\mu\text{g/l}$ , 1,0  $\mu\text{g/l}$  und 5,0  $\mu\text{g/l}$ ) zeigt die Folgen der beobachteten Infektion.

Eine getrennte Betrachtung nach beschalten und unbeschalten Embryonen bestätigt die Eindrücke der Gesamtansicht. Auch hier ist deutlich sichtbar ein Unterschied zwischen unbehandelter Kontrolle und den weiteren Ansätzen zu sehen. Die unbehandelten Kontrolltiere haben signifikant mehr beschaltete Embryonen als die Lösemittelkontrolle (Abb. 3.30 B). Weitere signifikante Differenzen zeigen sich hier nicht, keiner der behandelten Ansätze unterscheidet sich signifikant von der Lösemittelkontrolle. Es ist kein Substanzeffekt zu erkennen. Die Zahlen der beschalten Embryonen unterscheiden sich in den weiteren Behandlungsstufen nicht von der Lösemittelkontrolle.



Bei Betrachtung der unbeschalten Embryonen ergeben sich in allen Behandlungsstufen signifikante Unterschiede zur Lösemittelkontrolle (Abb. 3.30 C). Die unbehandelte Kontrolle weist mehr Embryonen als alle anderen Ansätze auf, unterscheidet sich jedoch nicht signifikant von der Lösemittelkontrolle.



**Abb. 3.30.** Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*, Testsubstanz Clofibrinsäure. Auswertung t56. Je 3 Replikate à 20 Schnecken.

A): Gesamtzahl der Embryonen

B): Anzahl beschalter Embryonen

C): Anzahl unbeschalter Embryonen

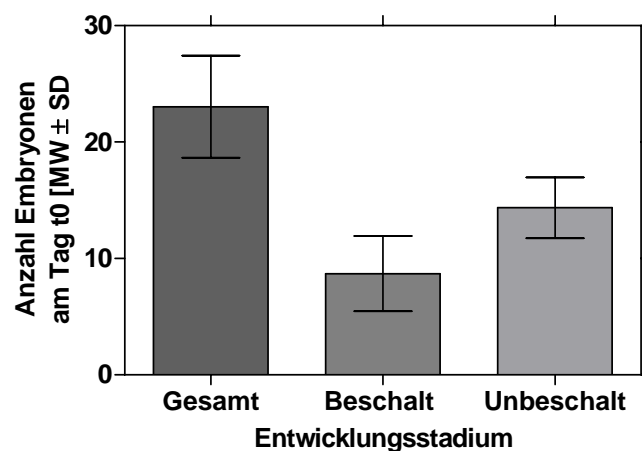
Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple-Comparison-Test

★ =  $p < 0,05$ , ★★ =  $p < 0,01$ , ★★★ =  $p < 0,001$

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die auftretenden Schwankungen zufällig erscheinen. Hinzu kommt die auffällige Schädigung der lösemittelbehandelten Ansätze durch eine Bakterien- oder Pilzinfektion. Die erniedrigten Embryonenzahlen in diesen Ansätzen sind mit großer Wahrscheinlichkeit auf diese Infektion zurückzuführen, zumal die Embryonenzahlen der Lösemittelkontrolle durchweg niedriger als die der Kontrolle liegen.

### 3.2.3 Ciprofloxacin

Der Versuch wurde am 29.09.2003 mit Einsetzen von je 60 Schnecken pro Versuchsgefäß begonnen (t0). Zur Bestimmung der Embryonenzahlen an diesem Zeitpunkt wurden 20 Tiere ausgewertet (Abb. 3.31).



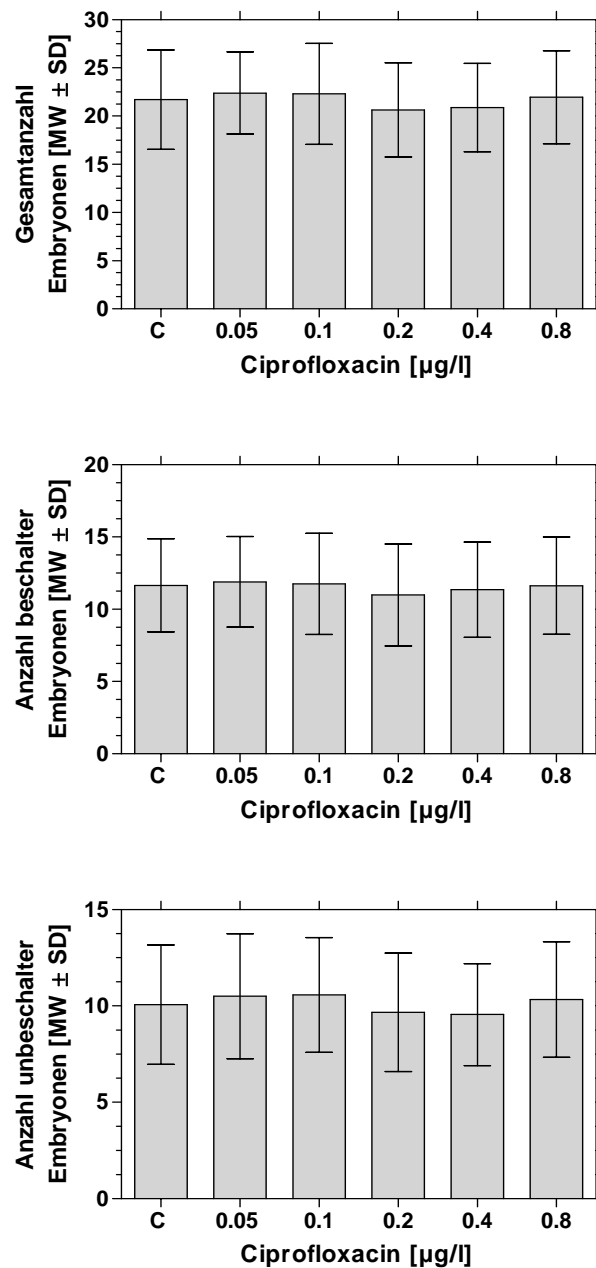
**Abb. 3.31.** Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*, Testsubstanz Ciprofloxacin. Embryonenzahlen zu Versuchsbeginn. n = 30.

Mit einer durchschnittlichen Embryonengesamtzahl von 23,1 beziehungsweise im Schnitt 8,7 beschalteten und 14,4 unbeschalteten Embryonen befinden sich die Tiere zu Versuchsbeginn in guter Kondition. Vorschäden liegen nicht vor.

#### - Embryonenzahlen am Versuchstag 14

Bei nur minimalen Unterschieden liegen die Gesamtzahlen aller Embryonen in sämtlichen Ansätzen fast gleichauf (Abb. 3.32 A). Signifikante Differenzen sind nicht zu erkennen. Gegenüber der Kontrolle haben die Ansätze 0,05 µg/l, 0,1 µg/l und 0,8 µg/l eine leicht erhöhte Embryonenzahl, doch beträgt der Unterschied nur einen Embryo. Die Embryonenzahl ist gegenüber t0 fast konstant geblieben.

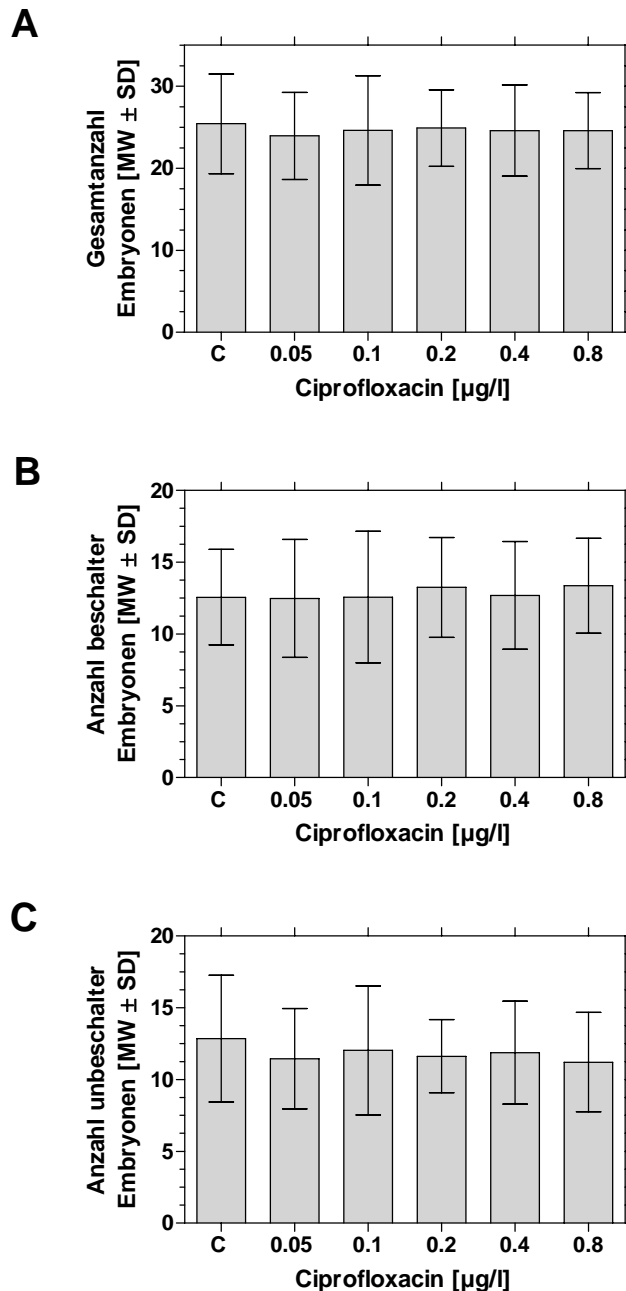
Bei Aufgliederung der Gesamtzahl in die Anteile beschalteter und unbeschalteter Embryonen ergibt sich ein praktisch unverändertes Bild (Abb. 3.32 B, C). Beide Grafiken bestätigen die bei Betrachtung der Gesamtzahl gefundenen Eindrücke. Signifikante Unterschiede sind nirgends zu erkennen, auch sind die Standardabweichungen in allen Ansätzen in etwa gleich groß.



**Abb. 3.32.** Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*, Testsubstanz Ciprofloxacin. Auswertung t14. Je 3 Replikate à 20 Schnecken.  
A): Gesamtzahl der Embryonen  
B): Anzahl beschafter Embryonen  
C): Anzahl unbeschafter Embryonen  
Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple-Comparison-Test

Die Embryonenzahlen präsentieren sich gegenüber der Auswertung am Tag 14 unverändert (Abb. 3.32 A). Wieder haben alle Ansätze praktisch gleich viele Embryonen. Die Kontrolltiere tragen im Durchschnitt mit 25,4 Embryonen zwar einen Embryo mehr als die übrigen Ansätze, in denen die Zahl bei rund 24 Embryonen liegt. Wieder unterscheiden sich die Standardabweichungen kaum.

- Embryonenzahlen am Versuchstag 28



**Abb. 3.33.** Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*, Testsubstanz Ciprofloxacin. Auswertung t28. Je 3 Replikate à 20 Schnecken.

A): Gesamtzahl der Embryonen

B): Anzahl beschalter Embryonen

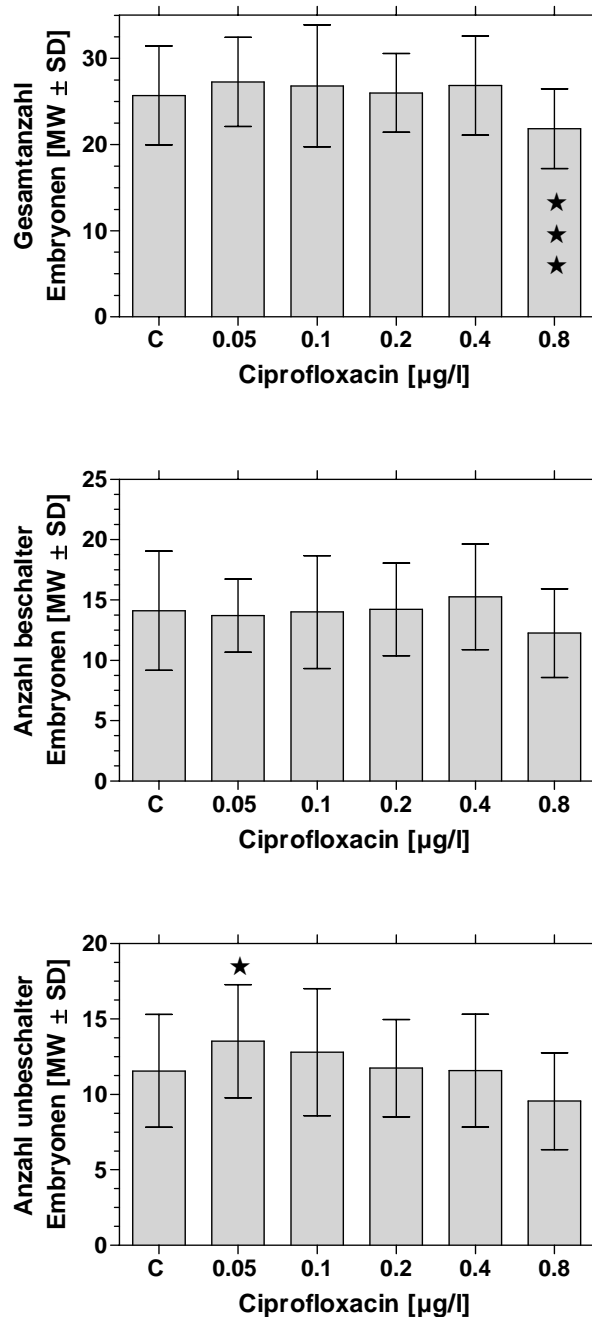
C): Anzahl unbeschalter Embryonen

Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple-Comparison-Test

Die Betrachtung der Daten getrennt nach beschalten und unbeschalten Embryonen bietet erneut keine von der Gesamtzahl abweichenden Erkenntnisse, die Anzahl der beschalten Embryonen ist in allen Ansätzen nahezu gleich (Abb. 3.33 B). Überall liegen etwa 12 Embryonen vor, in den Ansätzen 0,2 und 0,8  $\mu\text{g/l}$  finden sich im Schnitt 13 Embryonen. Bei annähernd gleichen Standardabweichungen zeigen die Verteilungsmuster ein gleichförmiges Bild.

Bei Betrachtung der unbeschalten Embryonen zeigt sich, dass hier in der Kontrolle mit 12,9 eine minimal höhere Embryonenzahlen vorhanden ist (Abb. 3.33 C). Der Unterschied beträgt nirgends mehr als zwei Embryonen, es handelt sich nicht um eine signifikante Differenz. Die übrigen Ansätze haben annähernd gleich viele Embryonen. Zu sehen ist lediglich, dass die Standardabweichungen etwas stärker variieren als bisher gesehen.

- Embryonenzahlen am Versuchstag 56



**Abb. 3.34.** Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*, Testsubstanz Ciprofloxacin. Auswertung t56. Je 3 Replikate à 20 Schnecken.

A): Gesamtzahl der Embryonen

B): Anzahl befruchteter Embryonen

C): Anzahl unbefruchteter Embryonen

Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple-Comparison-Test

★ =  $p < 0,05$

Erstmals zeigt sich ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle (Abb. 3.34 A). Mit 21,8 weist die Behandlungsstufe 0,8 µg/l durchschnittlich fast vier Embryonen weniger auf als die Kontrolle mit 25,7. Die Schnecken der weiteren Behandlungsstufen haben annähernd gleich viele Embryonen. Durchweg finden sich dort mehr Embryonen als in der Kontrolle, der Unterschied ist jedoch nirgends signifikant. Zum Versuchsende variieren die Standardabweichungen stärker als zu Beginn.

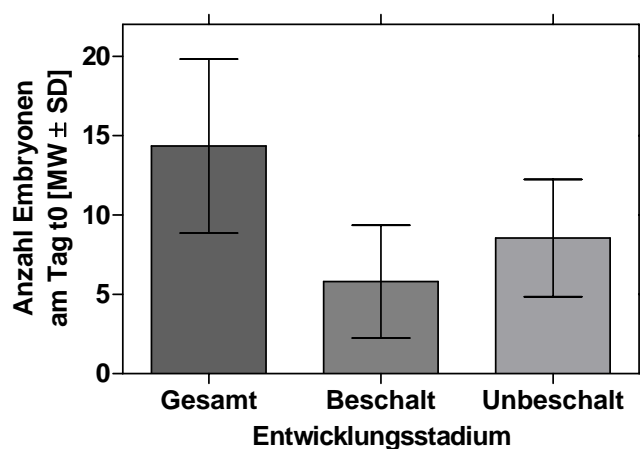
Die Zahl der beschalteten Embryonen ist nirgends signifikant verschieden (Abb. 3.34 B). Kontrolle und alle Behandlungsstufen, bis auf 0,8 µg/l, weisen annähernd gleiche Werte auf, lediglich die Schnecken der letzten Behandlungsstufe haben mit durchschnittlich 12,3 Embryonen fast zwei weniger als die Kontrolle mit 14,1. Bei leicht variierenden Standardabweichungen zeigen die Verteilungsmuster ein annähernd gleichförmiges Bild. Die im Vergleich der Gesamtembryonenzahlen auftretende Differenz spiegelt sich hier nicht wider.

Die unbeschalteten Embryonen zeigen ein etwas anderes Bild (Abb. 3.34 C): Mit 13,5 Embryonen weist die Behandlungsstufe 0,05 µg/l einen um zwei Embryonen höheren Wert als die Kontrolle (11,6) auf; dieser Unterschied ist signifikant. In den weiteren Behandlungsstufen sinkt die Zahl unbeschalteter Embryonen kontinuierlich ab, bis sie in der Behandlungsstufe 0,8 µg/l mit 9,55 einen um zwei Embryonen niedrigeren Wert als die Kontrolle zeigt. Die Standardabweichungen sind dabei annähernd gleich. Keine der Behandlungsstufen, außer 0,05 µg/l, weicht signifikant von der Kontrolle ab, so dass aufgrund des gegenläufigen Verteilungsmusters (erst erhöhte, dann absinkende Embryonenzahlen) ein eventueller Substanzeffekt nicht gesichert werden kann.

### 3.2.4 Fluoxetin

Die nachfolgend vorgestellten Daten wurden 2004 im Rahmen einer Diplomarbeit erhoben (HECKER 2004).

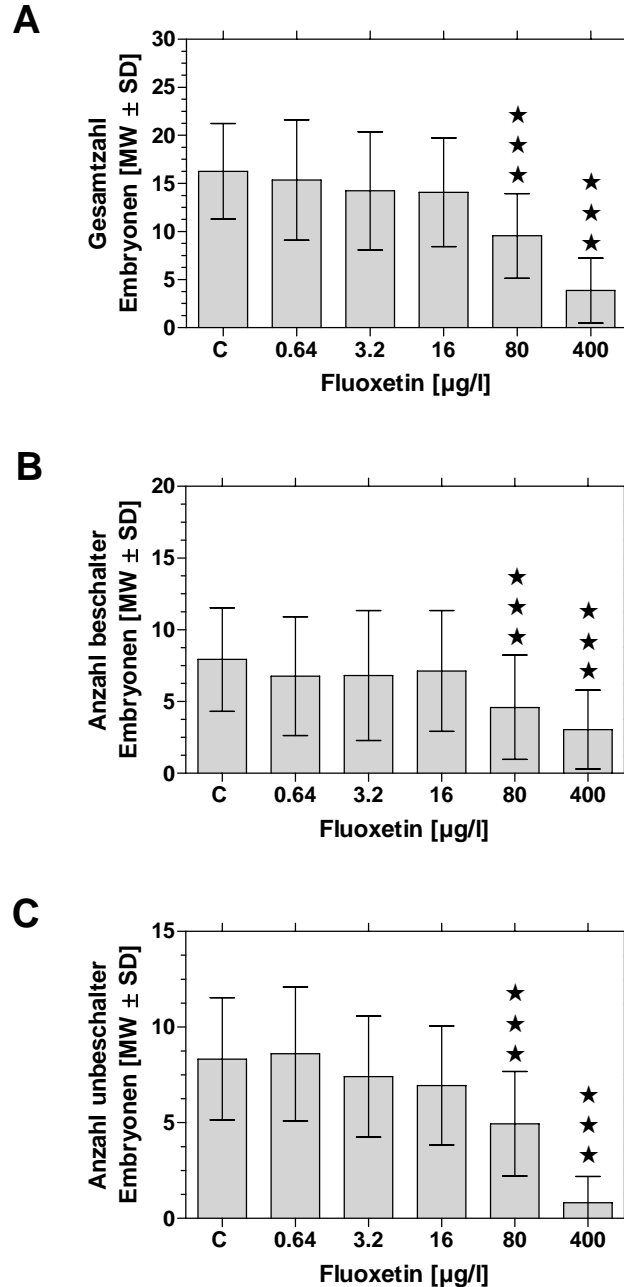
Der Versuch wurde am 09.03.2004 mit Einsetzen von je 80 Schnecken pro Versuchsgefäß begonnen (t<sub>0</sub>). Zur Bestimmung der Embryonenzahlen an diesem Zeitpunkt wurden exemplarisch 20 Tiere ausgewertet (Abb. 3.35).



**Abb. 3.35.** Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*, Testsubstanz Fluoxetin. Embryonenzahlen zu Versuchsbeginn. n = 30.

Mit einer durchschnittlichen Embryonengesamtzahl von 14,4 beziehungsweise im Schnitt 5,80 beschalten und 8,55 unbeschalten Embryonen befinden sich die Tiere zu Versuchsbeginn in guter Kondition. Vorschäden liegen nicht vor.

- Embryonenzahlen am Versuchstag 14



**Abb. 3.36.** Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*, Testsubstanz Fluoxetin. Auswertung t14. Je 3 Replikate à 20 Schnecken.

A): Gesamtzahl der Embryonen

B): Anzahl beschalter Embryonen

C): Anzahl unbeschalter Embryonen

Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple-Comparison-Test

★ =  $p < 0,05$ , ★★ =  $p < 0,01$ , ★★★ =  $p < 0,001$

Bereits nach vierzehn Tagen ist in den Behandlungsstufen 80 µg/l und 400 µg/l eine signifikante Reduzierung der Gesamtembryonenzahl im Bezug zur Kontrolle zu sehen (Abb. 3.36 A). Während die Schnecken dort durchschnittlich 16,3 Embryonen haben, sind in den betroffenen Behandlungsstufen nur 14,1 beziehungsweise 9,55 Embryonen feststellbar. Auch in den anderen Behandlungsstufen sind mit zunehmender Fluoxetinkonzentration rückläufige Embryonenzahlen zu sehen.

Zusätzlich konnte bereits wenige Tage nach Versuchsbeginn beobachtet werden, dass die Schnecken der höchsten Konzentration nicht mehr im Versuchsgefäß umherkrochen, sondern mit der Mündung nach oben am Boden des Versuchsgefäßes lagen. Bewegungen des Operculums zeigten, dass die Tiere trotz ihrer Reglosigkeit noch am Leben waren, einige erholten sich im weiteren Verlauf des Versuchs wieder.

Die Betrachtung der Embryonenzahlen getrennt nach beschalten und unbeschalten Embryonen zeigt ein ähnliches Bild. Das Verteilungsmuster der beschalten Embryonen gibt die in der Gesamtansicht vorhandene Konzentrations-Wirkungsbeziehung zwar nicht exakt wieder (Abb. 3.36 B), doch sind die Embryonenzahlen in den Behandlungsstufen 80 µg/l und 400 µg/l erneut signifikant geringer als in der Kontrolle. Einem Kontrollwert von 7,93 Embryonen stehen Zahlen von 4,60 beziehungsweise 3,05 gegenüber. Bemerkenswert sind große Standardabweichungen in allen Ansätzen.

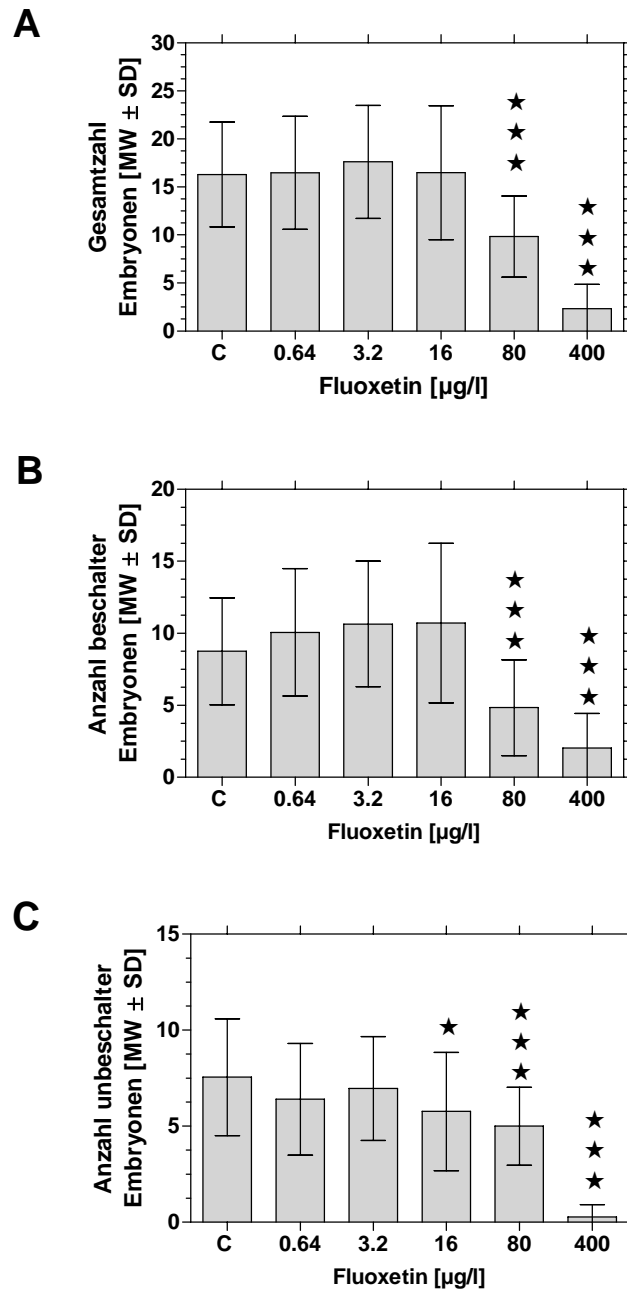
Die Betrachtung der unbeschalten Embryonen zeigt erneut die in der Gesamtübersicht erkennbare Dosis-Wirkungsbeziehung (Abb. 3.36 C). Nach einem leichten Anstieg in der Behandlungsstufe 0,64 µg/l sinkt die Zahl der unbeschalten Embryonen deutlich sichtbar ab, bis schließlich ab der Behandlungsstufe 80 µg/l ein signifikanter Effekt zu sehen ist. Offensichtlich reagiert *P. antipodarum* sehr empfindlich auf Fluoxetin. Die Embryonenneubildung ist schon nach kurzer Zeit merklich beeinflusst, geringere Effekte sind bereits bei niedrigen Fluoxetinkonzentrationen sichtbar.

#### - Embryonenzahlen am Versuchstag 21

Auch in dieser Auswertung sinken die Embryonenzahlen mit steigender Fluoxetinkonzentration (Abb. 3.37 A). Erneut sind die Embryonenzahlen der Behandlungsstufen 80 und 400 µg/l signifikant gegenüber der Kontrolle verschieden, dem Kontrollwert von 16,3 Embryonen stehen durchschnittlich 9,83 beziehungsweise 2,30 Embryonen gegenüber. Die Standardabweichungen sind denen der vorigen Auswertung vergleichbar. Auffällig ist, dass die erste Behandlungsstufe, 0,64 µg/l, praktisch gleich viele Embryonen wie die Kontrolle aufweist und in der folgenden, 3,2 µg/l, sogar mit 17,6 noch durchschnittlich ein Embryo mehr vorliegt. Von da ab sinken die Embryonenzahlen jedoch wieder und halbieren sich in der Behandlungsstufe 80 µg/l fast. Es ist also der gleiche Effekt wie in der vorigen Auswertung zu beobachten.

Die Betrachtung der beschalten Embryonen zeigt den in der Gesamtübersicht zu beobachtenden Anstieg der Embryonenzahlen noch deutlicher (Abb. 3.37 B). Bis einschließlich zur Behandlungsstufe 16 µg/l liegen durchschnittlich zwei Embryonen mehr als in der Kontrolle vor. Die Behandlungsstufen 80 und 400 µg/l weisen jedoch wieder deutlich weniger Embryonen auf. Während in der Kontrolle im Durchschnitt 8,75 Embryonen gezählt werden, sind es in diesen Ansätzen 4,83 und 2,05 Embryonen. Die Reduktion fällt erneut sehr drastisch aus. Die erhöhten Embryonenzahlen in der Behandlungsstufe 3,2 µg/l unterscheiden sich dagegen nicht signifikant von der Kontrolle.



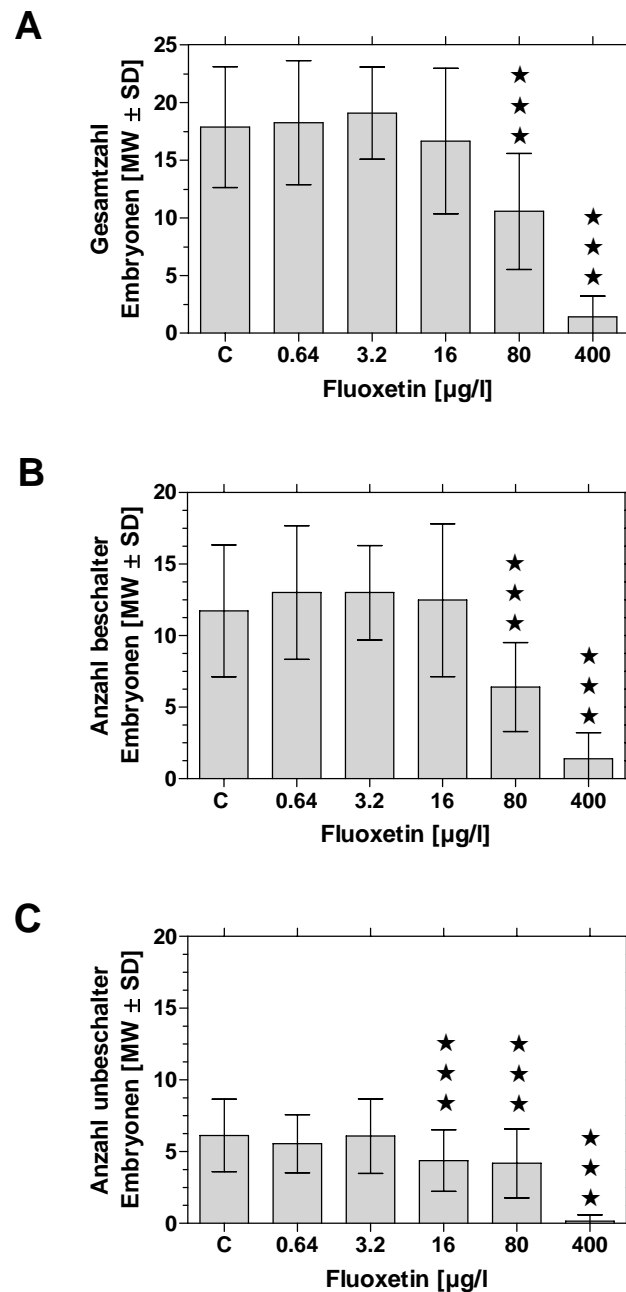


**Abb. 3.37.** Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*, Testsubstanz Fluoxetin. Auswertung t21. Je 3 Replikate à 20 Schnecken.  
A): Gesamtzahl der Embryonen  
B): Anzahl beschalter Embryonen  
C): Anzahl unbeschalter Embryonen  
Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple-Comparison-Test  
★ =  $p < 0,05$ , ★★★ =  $p < 0,001$

Bei Betrachtung der unbeschalten Embryonen zeigt sich nirgends ein höherer Wert als in der Kontrolle (Abb. 3.37 C). Die Daten weisen eine nahezu perfekte Konzentrations-Wirkungsbeziehung auf, abgesehen von einer zwischenzeitlich leicht erhöhten Embryonenzahl in der Behandlungsstufe 3,2  $\mu\text{g/l}$ . Die Embryonenzahlen in den Konzentrationsstufen

16, 80 und 400 µg/l sind signifikant niedriger als in der Kontrolle, sie betragen nur 5,77, 5,00 und 0,28 gegenüber dem Kontrollwert von 7,55.

- Embryonenzahlen am Versuchstag 28



**Abb. 3.38.** Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*, Testschubstanz Fluoxetin. Auswertung t28. Je 3 Replikate à 20 Schnecken.

A): Gesamtzahl der Embryonen

B): Anzahl befruchteter Embryonen

C): Anzahl unbefruchteter Embryonen

Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple-Comparison-Test

★★★ =  $p < 0,001$

Der bei der vorherigen Auswertung beobachtete Anstieg der Embryonenzahlen in den Konzentrationsstufen 0,64 bis 16 µg/l wiederholt sich nicht (Abb. 3.37 A). In den Schnecken der ersten Behandlungsstufe finden sich annähernd gleich viele Embryonen wie in der Kontrolle, in der Behandlungsstufe 3,2 µg/l geringfügig mehr. Anschließend sinkt die Embryonenzahl konzentrationsabhängig ab. Die beiden letzten Behandlungsstufen sind wie in den beiden vorangegangenen Auswertungen hochsignifikant von der Kontrolle verschieden. In den Kontrollansätzen finden sich im Schnitt 17,9 Embryonen, fast ein Drittel weniger in der Behandlungsstufe 80 µg/l. Mit durchschnittlich 1,40 Embryonen ist die Reproduktion der Schnecken in der am höchsten belasteten Behandlungsstufe beinahe zum Erliegen gekommen. Die Standardabweichungen werden zudem geringer, die Ergebnisse verfestigen sich.

Ein ähnliches Bild bieten die getrennten Betrachtungen der beschalten und unbeschalten Embryonen. Es finden sich zwar in allen belasteten Ansätzen zunächst geringfügig mehr beschaltete Embryonen in den Versuchstieren, doch tritt bereits ab der Behandlungsstufe 16 µg/l ein geringer Rückgang ein (Abb. 3.38 B). Anschließend zeigen sich, wie in allen vorangegangenen Auswertungen, erneut signifikant geringere Embryonenzahlen als in der Kontrolle. Dort werden noch 11,7 Embryonen gezählt, in der Behandlungsstufe 80 µg/l sind es mit 6,42 nur noch wenig mehr als die Hälfte, nach Behandlung mit 400 µg/l Fluoxetin werden nur noch 1,40 beschaltete Embryonen gefunden. Diese Zahlen bestätigen die Ergebnisse der vorangegangenen Auswertung.

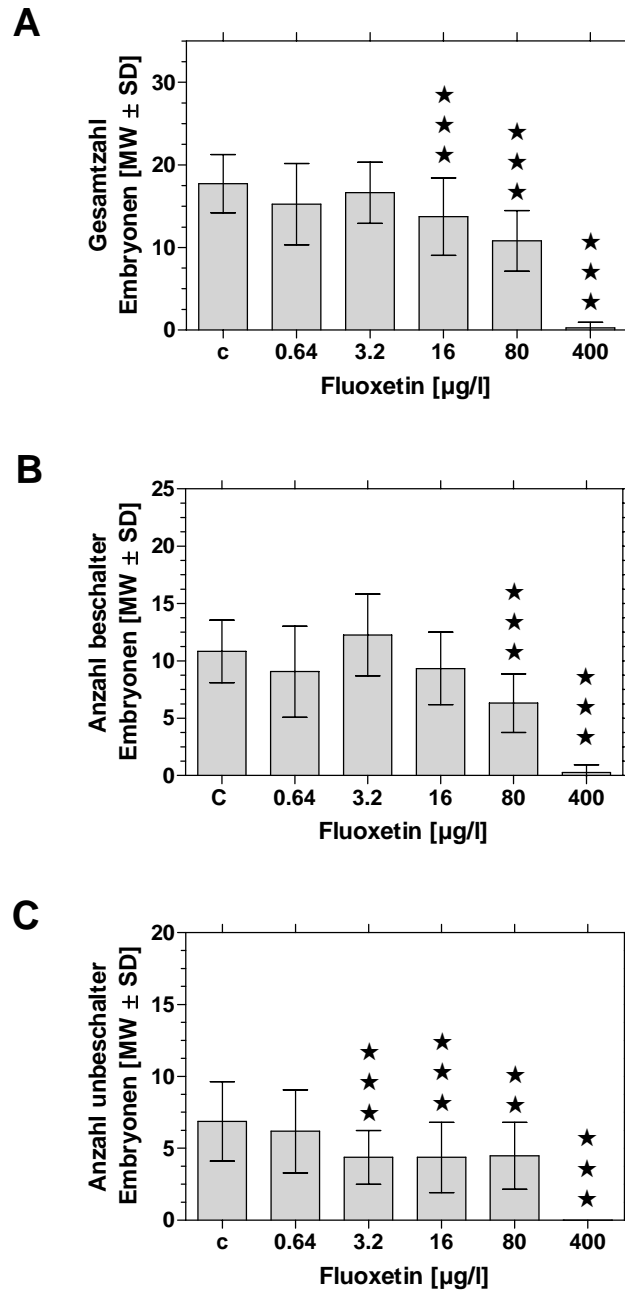
Bei Betrachtung der unbeschalten Embryonen zeigt sich nirgends in den belasteten Ansätzen eine Embryonenzahl, die höher als in der Kontrolle liegt (Abb. 3.38 C). Zwar weist die Behandlungsstufe 3,2 µg/l fast genauso viele unbeschaltete Embryonen wie die Kontrolle auf und etwas mehr als die vorangegangene Behandlungsstufe, doch folgen die Embryonenzahlen fast perfekt einer Konzentrations-Wirkungsbeziehung.

Auffällig ist, dass hier bereits in der Behandlungsstufe 16 µg/l eine signifikant geringere Embryonenzahl als in der Kontrolle vorliegt. Mit 4,38 sind in diesen Ansätzen fast genauso viele Embryonen wie in der Behandlungsstufe 80 µg/l (4,18) und somit ein Drittel weniger als in der Kontrolle (6,13). In der höchsten Behandlungsstufe finden sich nur noch vereinzelt unbeschaltete Embryonen, es ergibt sich ein Durchschnitt von 0,15. Offensichtlich intensiviert sich die Wirkung des Fluoxetins bei andauernder Exposition.

#### - Embryonenzahlen am Versuchstag 56

Wie eingangs erwähnt, wurden die Schnecken in der höchsten Testkonzentration nach wenigen Tagen immobilisiert. Zwischen den Auswertungen  $t_{28}$  und  $t_{56}$  starben diese Tiere, hauptsächlich in der letzten Versuchswoche. Embryonen wurden gezählt, soweit noch vorhanden.

Bei dieser Auswertung werden bereits in der Behandlungsstufe 16 µg/l signifikant weniger Embryonen als in der Kontrolle gebildet (Abb. 3.39 A). Während dort durchschnittlich 17,7 Embryonen gefunden werden, sind es bei 16 µg Fluoxetin/l nur noch 13,7. In der Folge reduzieren sich die Werte auf 10,8 beziehungsweise auf nur noch 0,28 Embryonen. Wie bereits zuvor beobachtet, zeigt sich in der Behandlungsstufe 3,2 µg/l erneut ein Anstieg der Embryonenzahlen, nachdem in der Behandlungsstufe 0,64 µg/l ein leichter Abfall zu sehen ist. Anschließend sinken die Embryonenzahlen mit steigenden Fluoxetinkonzentrationen.



**Abb. 3.39.** Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*, Testsubstanz Fluoxetin. Auswertung t56. Je 3 Replikate à 20 Schnecken.  
A): Gesamtzahl der Embryonen  
B): Anzahl beschalter Embryonen  
C): Anzahl unbeschalter Embryonen  
Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple-Comparison-Test  
★★ =  $p < 0,01$ , ★★★ =  $p < 0,001$

Die Betrachtung der beschalteten Embryonen bestätigt dieses Bild (Abb. 3.39 B). Der Anstieg bei 3,2 µg Fluoxetin/l ist noch deutlicher sichtbar, die Schnecken enthalten geringfügig mehr Embryonen als die Kontrolle. Die vorangegangene und die folgende Behandlungsstufe enthalten etwa gleich viele Embryonen, beidesmal weniger als in der Behandlungsstufe 3,2 µg/l. Die Embryonenzahl in der Behandlungsstufe 16 µg/l ist noch nicht signifikant erniedrigt. Wie zuvor finden sich erst in den Behandlungsstufen 80 und 400 µg/l signifikant weniger Embryonen als in der Kontrolle. Mit 6,32 Embryonen weist die Behandlungsstufe nur noch etwas mehr als die Hälfte der durchschnittlichen Embryonen der Versuchstiere in der Kontrolle auf (10,9), mit im Schnitt 0,28 Embryonen pro Schnecke finden sich in der Behandlungsstufe 400 µg/l nur noch vereinzelt Embryonen.

Noch drastischer sind die Effekte bei Betrachtung der unbeschalteten Embryonen (Abb. 3.39 C). Nirgends zeigt sich mehr ein Anstieg der Embryonenzahlen in den belasteten Ansätzen, wie er bisher in der Behandlungsstufe 3,2 µg/l zu beobachten war. In keinem der belasteten Ansätze werden mehr Embryonen als in der Kontrolle gezählt. Bereits ab der Behandlungsstufe 3,2 µg/l ist der Unterschied signifikant. In der höchsten Testkonzentration können keine unbeschalteten Embryonen mehr festgestellt werden. In den Behandlungsstufen 3,2 bis 80 µg/l liegen die Embryonenzahlen einheitlich bei 4,3 Embryonen gegenüber 6,87 in der Kontrolle.

Auf Basis der analytisch bestimmten Konzentrationen errechnet sich für die unbeschalteten Embryonen eine  $EC_{10}$  von 0,81 µg/l und eine  $EC_{50}$  von 36,1 (6,93-188) µg/l.

### 3.3 *Lumbriculus variegatus*

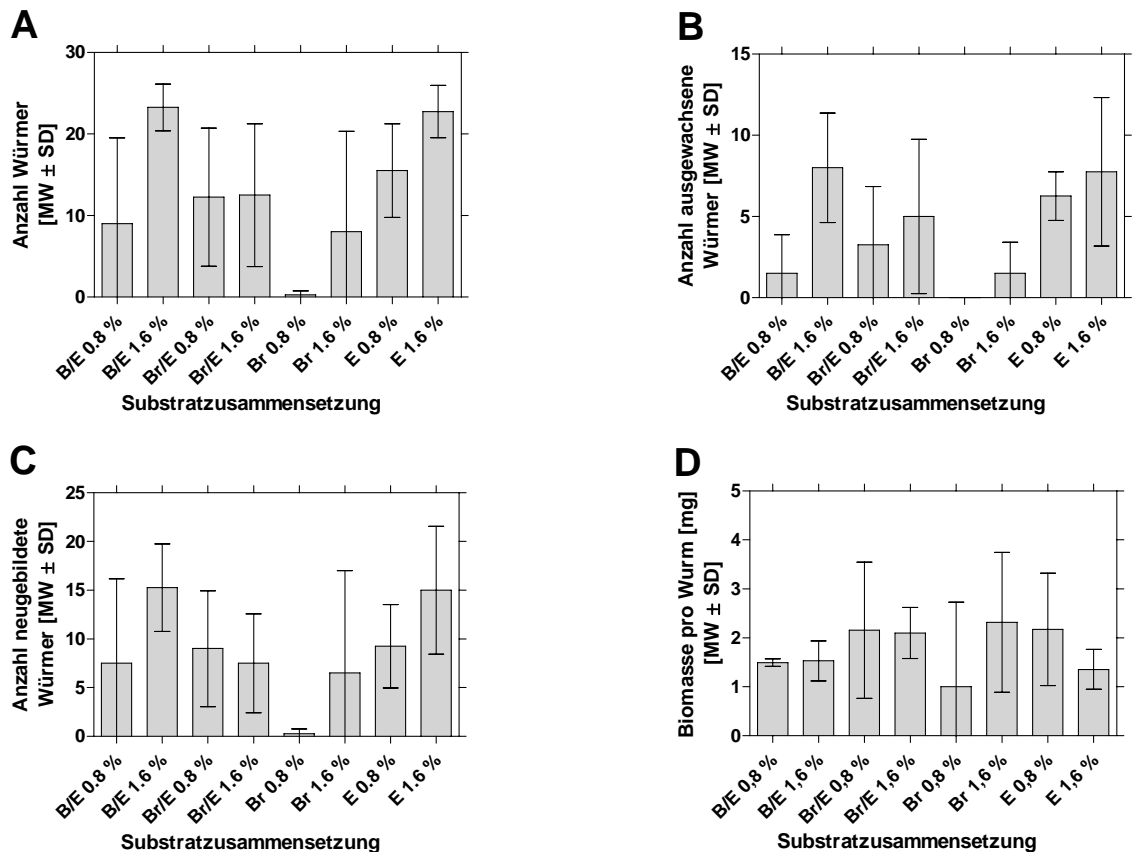
#### 3.3.1 Ernährungsversuch

Bevor mit Versuchen zur Wirkung der Testsubstanzen auf *L. variegatus* begonnen werden konnte, musste zunächst die optimale Art der Kohlenstoffzugabe zum Sediment überprüft werden. Es wurde daher die Eignung von Buchenlaub, Erlenlaub und Brennesselblättern untersucht. Vorrangig wurden Erlenlaub und Brennesselblätter als die Blätter typischer Uferbewuchspflanzen untersucht. Buche wurde nur in Verbindung mit Erle getestet. Der Versuch begann am 25.10.2002. Nach einer Alterungsphase von 14 Tagen wurden am 08.11.2002 pro Versuchsgefäß zehn synchronisierte Würmer eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.40 dargestellt. Die Kohlenstoffanteile sind stets in Gew.-% angegeben.

Eindeutiges Ergebnis ist, dass bei einer Kohlenstoffzugabe von 0,8 Gew.-%, unabhängig von der Art der Kohlenstoffquelle, kaum Reproduktion stattfindet (Abb. 3.40 A). In sämtlichen Ansätzen mit dieser Menge sind am Versuchsende kaum mehr oder sogar weniger Würmer vorhanden. In den Ansätzen mit 0,8% reinem Brennesselanteil sind praktisch alle Würmer lysiert. Auch in den anderen Ansätzen mit Brennesselzugabe sind zum Versuchsende deutlich weniger Würmer vorhanden. Die beste Reproduktion hat in den Ansätzen mit 1,6 % brennesselfreiem Kohlenstoffanteil stattgefunden. Die Ansätze mit 1,6% Erle und mit 1,6% Buchen/Erlengemisch 50:50 weisen praktisch gleiche Wurmzahlen auf, wobei die Schwankung in den Ansätzen mit Buchen/Erlengemisch etwas geringer ist.

Die Betrachtung der Würmer, getrennt nach ausgewachsenen und neugebildeten Tieren, bestätigt den Trend der Gesamtübersicht (Abb. 3.40 B, C). Zwar sind teilweise sogar mehr

neugebildete als ausgewachsene Würmer vorhanden, doch insgesamt weit weniger als in den Ansätzen mit 1,6% Kohlenstoff. Die schädliche Wirkung der Brennessel zeigt sich auch in dieser Betrachtung. Es sind keine ausgewachsenen und kaum junge Würmer vorhanden. Die Ansätze mit 1,6% reinem Erlenlaub und 1,6% Buchen/Erlenlaubmischung weisen annähernd gleich viele ausgewachsene wie junge Würmer auf. In beiden Fällen sind jedoch die Standardabweichungen in den Ansätzen mit Buchen/Erlenlaubmischung geringer, so dass die Reproduktion hier offensichtlich stabiler ist.



**Abb. 3.40:** Reproduktionstest mit *Lumbriculus variegatus*. Überprüfung verschiedener Kohlenstoffquellen. Je 3 Replikate.

A): Gesamtzahl der Würmer in allen Versuchsansätzen

B): Zahl der ausgewachsenen Würmer

C): Zahl der neugebildeten Würmer

D): Biomasse pro Wurm

One-Way-Anova mit Tukey's Multiple-Comparison-Test

B = Buche, E = Erle, Br = Brennessel

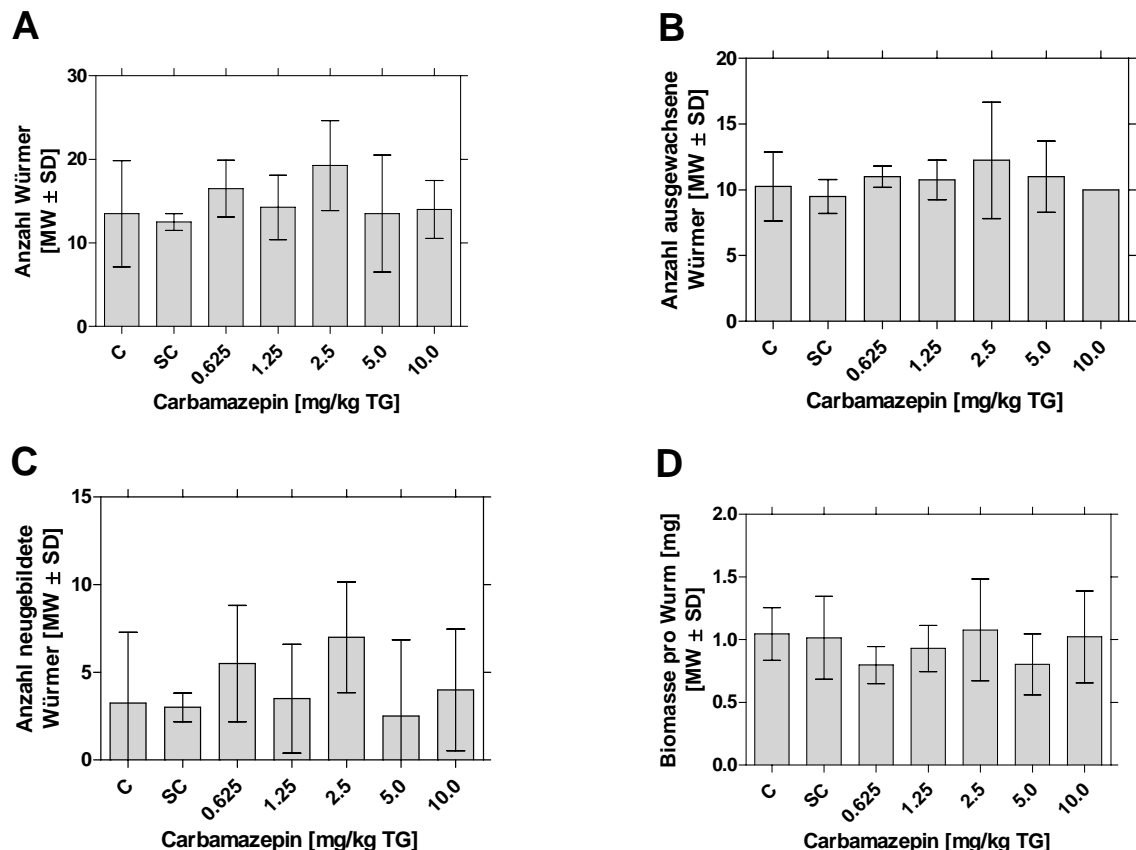
Die Betrachtung der Biomasse pro Wurm liefert auf den ersten Blick ein etwas widersprüchliches Bild, da auch in den Ansätzen, in denen nur wenige Würmer gefunden wurden, hohe Biomassen vorhanden sind (Abb. 3.40 D). Tatsächlich wurden in diesen Ansätzen zwar gut genährte, aber nur sehr wenige Würmer gefunden; da sich die gemessene Biomasse nur auf wenige Würmer verteilt, kommen diese Werte zustande. Im Vergleich der Ansätze mit 1,6% Erlenlaub bzw. 1,6% Buchen/Erlenlaubmischung findet sich die höhere Biomasse pro Wurm in den letzteren Ansätzen. Somit wurde als Kohlenstoffquelle eine Mischung aus je 0,8% Buchen- und Erlenlaub verwendet, entsprechend 1,6% Gesamt-Kohlenstoff, verwendet.

## 3.3.2 Carbamazepin

Der Versuch begann am 08.01.2003. Nach einer Alterungsphase von 14 Tagen wurden am 22.01.2003 pro Versuchsgefäß zehn synchronisierte Würmer eingesetzt.

Nach 28 Tagen wurden stark schwankende Wurmzahlen sowohl zwischen, als auch innerhalb der Behandlungsstufen festgestellt (Abb. 3.41 A). Während die Werte der Lösemittelkontrolle fast konstant sind, weichen die einzelnen Replikate der Kontrolle und der Behandlungsstufe 5 mg/kg TG stark voneinander ab. Keiner der Werte ist zur Lösemittelkontrolle signifikant verschieden. Den erhöhten Wurmzahlen in den Ansätzen 0,625 mg/kg TG und 2,5 mg/kg TG stehen in den übrigen belasteten Ansätzen Werte gegenüber, die fast völlig mit den Zahlen aus Kontrolle und Lösemittelkontrolle übereinstimmen.

Die Betrachtung getrennt nach ausgewachsenen und jungen Würmern bestätigt den Eindruck der Gesamtübersicht. Betrachtet man die ausgewachsenen Würmer (Abb. 3.41 B), so zeigen sich nahezu einheitliche Zahlen. Bis auf den etwas höheren Durchschnittswert in der Behandlungsstufe 2,5 mg/kg schwanken die Zahlen nur um rund 1. Es zeigen sich keine signifikanten Differenzen. In der höchsten Behandlungsstufe finden sich in allen Ansätzen zehn ausgewachsene Würmer.



**Abb. 3.41:** Reproduktionstest mit *Lumbriculus variegatus*. Testsubstanz Carbamazepin

A): Gesamtzahl der Würmer in allen Versuchsansätzen

B): Zahl der ausgewachsenen Würmer

C): Zahl der neugebildeten Würmer

D): Biomasse pro Wurm

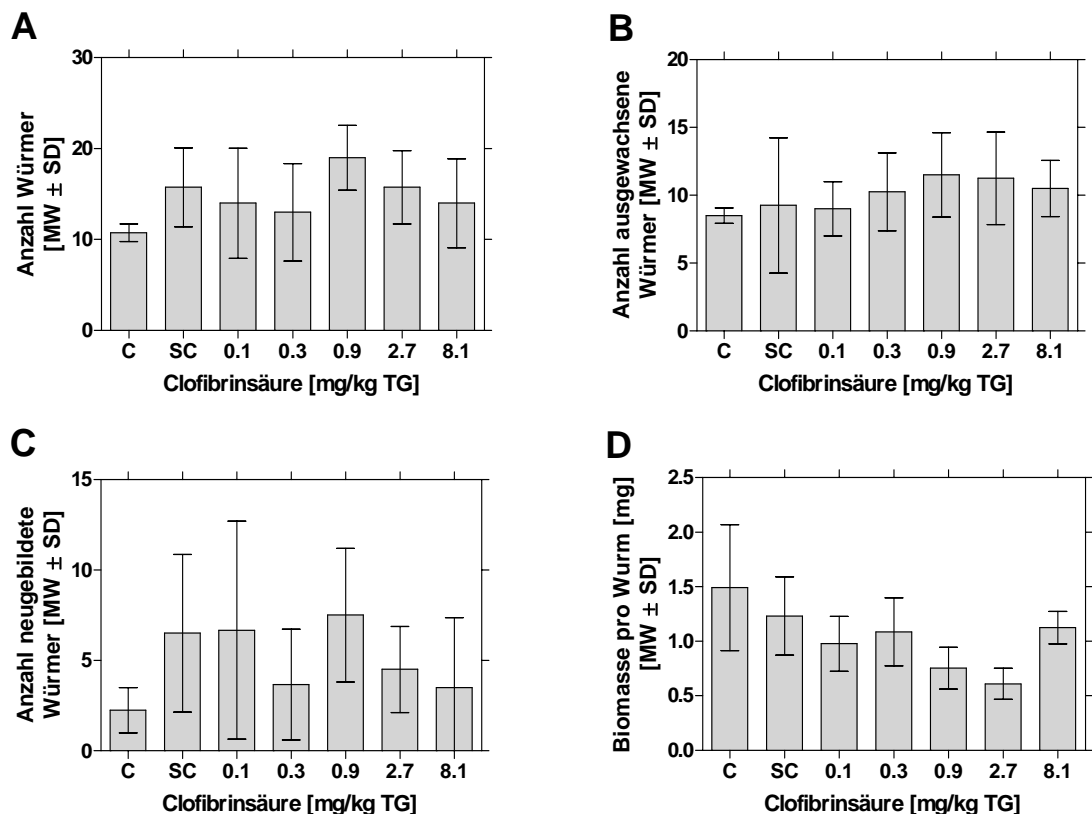
One-Way-Anova mit Dunnett's Multiple Comparison Test. Je 3 Replikate.

Betrachtet man die neugebildeten Würmer (Abb. 3.41 C), fallen sofort die hohen Standardabweichungen auf. Zum Teil werden innerhalb einer Behandlungsstufe in einem Ansatz neun, in anderen kein Wurm neugebildet. Dies zieht sich, wie die Abbildung deutlich macht, durch alle Behandlungsstufen, auch die unbelastete Kontrolle ist betroffen. Aufgrund der Schwankungen sind auch die hohen Durchschnittswerte in den Ansätzen 0,625 und 2,5 mg/kg TG nicht signifikant von der Lösemittelkontrolle verschieden. Die höheren Werte in diesen Ansätzen sind für den hohen Gesamtdurchschnitt verantwortlich, da die ausgewachsenen Würmer in allen Ansätzen konstante Werte aufweisen.

Die Biomasse pro Wurm (Abb. 3.41 D) ist in allen Behandlungsstufen annähernd gleich, nirgends existieren signifikante Unterschiede. Die Werte in den Behandlungsstufen 0,625, 1,25 und 5 mg/kg TG liegen geringfügig niedriger, die der übrigen behandelten Ansätze praktisch gleichauf mit denen der Kontrolle.

### 3.3.3 Clofibrinsäure

Der Versuch begann am 17.02.2003. Nach einer Alterungsphase von 14 Tagen wurden am 03.03.2003 pro Versuchsgefäß zehn synchronisierte Würmer eingesetzt.



**Abb. 3.42:** Reproduktionstest mit *Lumbriculus variegatus*. Testsubstanz Clofibrinsäure  
 A): Gesamtzahl der Würmer in allen Versuchsansätzen  
 B): Zahl der ausgewachsenen Würmer  
 C): Zahl der neugebildeten Würmer  
 D): Biomasse pro Wurm  
 One-Way-Anova mit Dunnett's Multiple Comparison Test. Je 3 Replikate.



Die Gesamtzahlen der Würmer in den unterschiedlichen Behandlungsstufen differieren stark, jedoch unterscheidet sich kein Wert signifikant von der Lösemittelkontrolle (Abb. 3.42 A). Mit durchschnittlich 10,8 Würmern weist die unbehandelte Kontrolle den niedrigsten Wert auf, die höchste Anzahl findet sich in der Behandlungsstufe 0,9 mg/kg TG mit 19,0 Würmern. Die Schwankungen folgen keinem Trend.

Gleiches gilt für die Zahlen der ausgewachsenen und jungen Würmer. Die Anzahl der ausgewachsenen Würmer (Abb. 3.42 B) ist, abgesehen von einer geringen Differenz gegenüber der Lösemittelkontrolle ( $\pm 1$  Wurm), in den Behandlungsstufen 0,9 und 2,7 mg/kg TG kaum verschieden.

Wesentlich stärker schwanken die Werte der jungen Würmer (Abb. 3.42 C). Allein in der Lösemittelkontrolle sind mehr als doppelt so viele Würmer neu gebildet worden wie in der Kontrolle. In den Behandlungsstufen 0,1 mg/kg TG und 0,9 mg/kg TG liegen ebenfalls viele junge Würmer vor, die Konzentrationsstufen 0,3 mg/kg TG, 2,7 mg/kg TG und 8,1 mg/kg TG zeigen niedrigere Reproduktionsraten. Auffällig sind die zum Teil großen Standardabweichungen, so dass keine signifikanten Unterschiede zur Lösemittelkontrolle vorliegen.

Die Biomasse pro Wurm scheint auf den ersten Blick mit zunehmenden Konzentrationen abzunehmen (Abb. 3.42 D). In der statistischen Überprüfung ist jedoch keiner der Werte signifikant von der Lösemittelkontrolle verschieden (One-Way-Anova mit Dunnett's Multiple Comparison Test,  $p > 0,05$ ). Hinzu kommt der erneut höhere Wert in der Behandlungsstufe 8,1 mg/kg TG, der nur noch um 0,1 mg von dem Wert der Lösemittelkontrolle abweicht.

### 3.3.4 Ciprofloxacin

#### a) Serie I

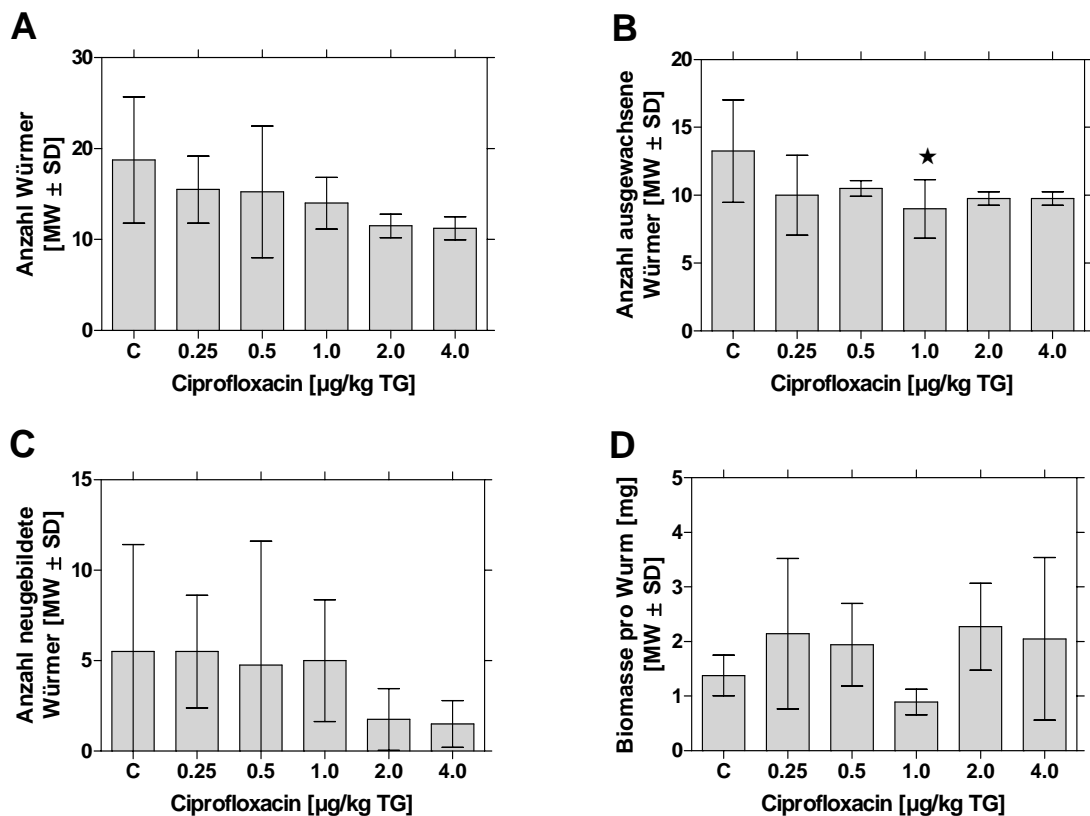
Der Versuch begann am 08.03.2003. Nach einer Alterungsphase von 14 Tagen wurden am 22.03.2003 pro Versuchsgefäß zehn synchronisierte Würmer eingesetzt.

Es fällt auf, dass die Gesamtzahlen der Würmer in allen Behandlungsstufen mit zunehmenden Konzentrationen abnehmen (Abb. 3.43 A). Aufgrund der hohen Schwankungen in der Kontrolle (eine Lösemittelkontrolle war nicht erforderlich, da Ciprofloxacin sehr gut wasserlöslich ist) können jedoch trotz der großen Unterschiede keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Unterschiede zur Kontrolle (18,8 Würmer) betragen bei den beiden höchsten Behandlungsstufen mit 11,5 und 11,3 jeweils sieben Würmer. Trotz der mit zunehmender Ciprofloxacinkonzentration sinkenden Wurmanzahl finden sich keine signifikanten Unterschiede.

Betrachtet man die ausgewachsenen Würmer separat (Abb. 3.43 B), so zeigt sich kein der Gesamtübersicht vergleichbarer Trend. Zwar finden sich in fast allen belasteten Ansätzen vier Würmer weniger als in der Kontrolle, doch ist der Unterschied aufgrund der hohen Standardabweichungen nur in der Behandlungsstufe 1,0  $\mu\text{g/kg}$  TG signifikant. Die davorliegenden und folgenden Behandlungsstufen enthalten mehr Würmer. Auffällig ist, dass die Schwankungen nur in der Kontrolle so hoch sind. In allen anderen Ansätzen ist die Zahl der Würmer wesentlich stabiler.

Die Zahlen der jungen Würmer zeigen ein Bild, das eher der Gesamtdarstellung entspricht (Abb. 3.43 C). Bis einschließlich Behandlungsstufe 1,0 µg/kg unterscheiden sich die Zahlen bei teilweise sehr hohen Standardabweichungen kaum, während die Werte der beiden letzten Behandlungsstufen um vier Würmer niedriger liegen. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Die Schwankungen in Kontrolle und der Behandlungsstufe 0,5 µg/kg TG variieren zwischen einem und 15 neugebildeten Würmern.

Die Biomasse pro Wurm zeigt keine Effekte. In Kontrolle und Behandlungsstufe 1,0 µg/kg TG haben die Würmer eine sehr geringe, in den übrigen Behandlungsstufen eine fast doppelt so hohe Biomasse (Abb. 3.43 D).

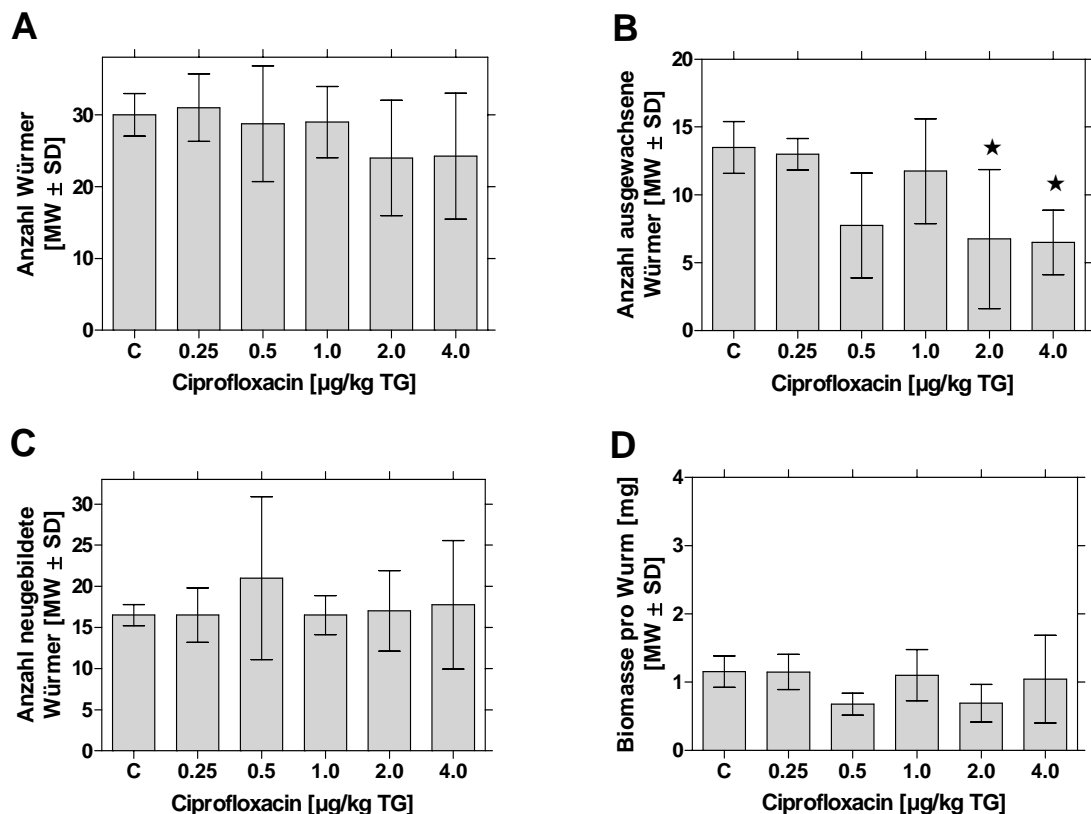


**Abb. 3.43:** Reproduktionstest mit *Lumbriculus variegatus*. Testsubstanz Ciprofloxacin, Serie I  
 A): Gesamtzahl der Würmer in allen Versuchsansätzen  
 B): Zahl der ausgewachsenen Würmer  
 C): Zahl der neugebildeten Würmer  
 D): Biomasse pro Wurm  
 One-Way-Anova mit Dunnett's Multiple Comparison Test, ★ =  $p < 0,05$ . Je 3 Replikate.

#### b) Serie II

Der Versuch begann am 16.08.2003. Nach einer Alterungsphase von 14 Tagen wurden am 30.08.2003 pro Versuchsgefäß zehn synchronisierte Würmer eingesetzt.

Die Wiederholung bestätigt die Ergebnisse des ersten Versuchs. Erneut ist mit zunehmender Ciprofloxacinkonzentration ein Rückgang der Wurmzahlen zu erkennen (Abb. 3.44 A); die Zahlen in den höchstbelasteten Behandlungsstufen unterscheiden sich jedoch nicht signifikant von der Kontrolle (One-Way-Anova mit Dunnett's Multiple Comparison Test,  $p > 0,05$ ). In den Kontrollansätzen werden durchschnittlich 30 Würmer gezählt. Mit einem Wurm mehr ist in der folgenden Behandlungsstufe ein minimaler Anstieg zu verzeichnen, anschließend nehmen die Zahlen ab und erreichen mit 24,0 beziehungsweise 24,3 in den Behandlungsstufen 2 und 4  $\mu\text{g/kg}$  TG die niedrigsten Werte.



**Abb. 3.44:** Reproduktionstest mit *Lumbriculus variegatus*. Testsubstanz Ciprofloxacin, Serie II  
 A): Gesamtzahl der Würmer in allen Versuchsansätzen  
 B): Zahl der ausgewachsenen Würmer  
 C): Zahl der neugebildeten Würmer  
 D): Biomasse pro Wurm  
 One-Way-Anova mit Dunnett's Multiple Comparison Test, ★ =  $p < 0,05$ . Je 3 Replikate.

Bei Betrachtung der Würmer getrennt nach ausgewachsenen und jungen Tieren fällt auf, dass, im Gegensatz zum ersten Versuch, kaum ein Unterschied innerhalb der jungen Würmer zu beobachten ist (Abb. 3.44 C). Waren im ersten Versuch in den Behandlungsstufen 2,0 und 4,0  $\mu\text{g/kg}$  TG noch deutlich weniger Würmer als in der Kontrolle festzustellen, so sind nun in der höchsten Behandlungsstufe durchschnittlich 17,8 junge Würmer vorhanden, in der Kontrolle hingegen nur 16,5. Von der Behandlungsstufe 0,5  $\mu\text{g/kg}$  TG abgesehen, in

der die Anzahl mit 21,0 Würmern deutlich über dem Schnitt liegt, findet sich in allen Behandlungsstufen praktisch die gleiche Zahl an jungen Würmern, ein deutlicher Unterschied zum vorangegangenen Versuch.

Der bei den Gesamtzahlen sichtbare Unterschied geht in diesem Fall von den ausgewachsenen Würmern aus (Abb. 3.44 B). In den Behandlungsstufen 0,5, 2,0 und 4,0 µg/kg TG ist eine deutlich geringere Wurmzahl als in der Kontrolle festzustellen, in den beiden höchsten Konzentrationen ist der Unterschied signifikant. Mit durchschnittlich 6,75 bzw. 6,50 Würmern sind hier weniger als halb so viele Würmer wie in der Kontrolle festzustellen (durchschnittliche Anzahl: 13,5). In der Behandlungsstufe sind kaum mehr Würmer vorhanden, doch ist der Unterschied aufgrund der hohen Streuung nicht signifikant (One-Way-Anova mit Dunnett's Multiple Comparison Test,  $p > 0,05$ ). Somit ist die Verteilung von ausgewachsenen und jungen Würmern in diesem Versuch genau umgekehrt zum vorigen.

Die Biomasse pro Wurm ist, abgesehen von den Behandlungsstufen 0,5 und 2,0 µg/kg TG überall praktisch gleich (Abb. 3.44 D). Lediglich in den genannten Ansätzen finden sich deutlich geringere Biomassen. In der Kontrolle liegt der Durchschnittswert für einen Wurm bei 1,16 mg, in der Behandlungsstufe 0,5 mg/kg TG bei 0,68 mg und in der Behandlungsstufe 2,0 µg/kg TG bei 0,69 mg. Die anderen Werte unterscheiden sich kaum.

### 3.3.5 Fluoxetin

Der Versuch wurde im Rahmen einer Diplomarbeit von HECKER (2004) ausgeführt. Er begann am 27.04.2004. Nach einer Alterungsphase von 14 Tagen wurden am 11.05.2003 pro Versuchsgefäß zehn synchronisierte Würmer eingesetzt.

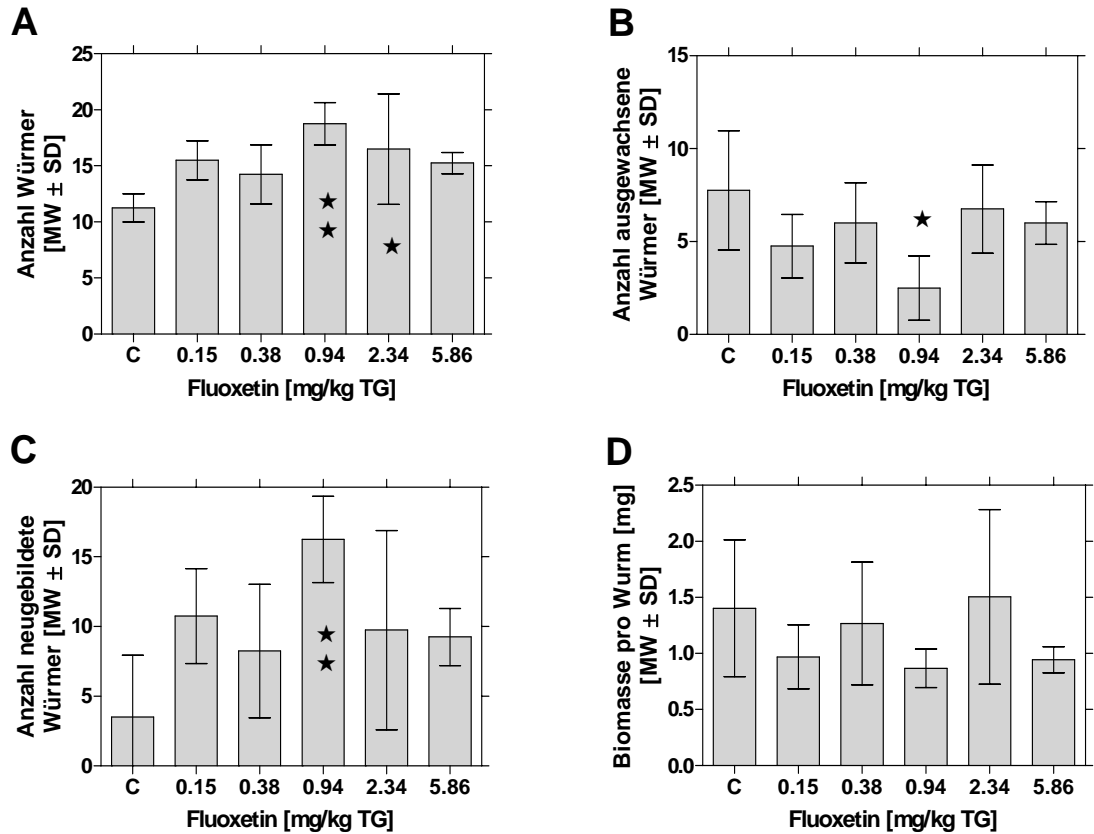
Die Zahlen der Würmer in den einzelnen Behandlungsstufen liefern ein auffälliges Bild (Abb. 3.45 A): Es liegen durchgehend mehr Würmer in den behandelten Ansätzen als in der Kontrolle vor. Die Wurmzahlen nehmen bis zur Behandlungsstufe 0,94 mg/kg TG zu, anschließend sinken sie wieder ab. Es zeigt sich eine umgekehrte U-Kurve. In den Behandlungsstufen 0,94 und 2,34 mg/kg TG unterscheiden sich die Wurmzahlen signifikant von der Kontrolle, mit durchschnittlich 18,8 beziehungsweise 16,5 finden sich hier deutlich mehr Tiere als in der Kontrolle (11,3).

Die Zahlen der jungen Würmer verhalten sich ähnlich wie die Gesamtwerte (Abb. 3.45 C). Auch hier bewegen sich die Wurmzahlen auf einer umgekehrten U-Kurve, sie steigen im Vergleich zur Kontrolle, in der nur durchschnittlich 3,25 Tiere vorhanden sind, deutlich an und erreichen in der Behandlungsstufe 0,94 mg/kg TG mit 16,3 einen signifikant von der Kontrolle verschiedenen Spitzenwert. Anschließend sind die Wurmzahlen wieder rückläufig.

Die Zahlen der ausgewachsenen Würmer zeigen ein umgekehrtes Bild (U-Kurve, Abb. 3.45 B); hier sinken die Werte bis zur Behandlungsstufe 0,94 mg/kg TG ab, bei der letztgenannten Behandlungsstufe liegt mit durchschnittlich 2,50 Würmern ein signifikant niedrigerer Wert als in der Kontrolle vor (7,75). Anschließend steigen die Wurmzahlen.

Die Biomasse pro Wurm folgt dem beobachteten Trend nicht eindeutig (Abb. 3.45 D). Die Behandlungsstufe 0,94 mg/kg TG weist mit einer Biomasse von 0,87 mg/Wurm den geringsten Wert auf (nicht signifikant verschieden zur Kontrolle, One-Way-Anova mit Dunnett's Multiple Comparison Test;  $p > 0,05$ ). Dieser Wert entspricht den zahlreichen kleinen Würmern in diesem Ansatz. Die Werte der anderen Behandlungsstufen zeigen jedoch kein kon-

tinuierliches Absinken bis zur beziehungsweise einen Anstieg ab der Behandlungsstufe 0,94 mg/kg TG. Auffällig ist, dass in der Kontrolle der höchste Biomassenwert vorliegt. Alle weiteren Werte folgen der beobachteten U-Kurve nicht.



**Abb. 3.45:** Reproduktionstest mit *Lumbriculus variegatus*. Testsubstanz Fluoxetin

A): Gesamtzahl der Würmer in allen Versuchsansätzen

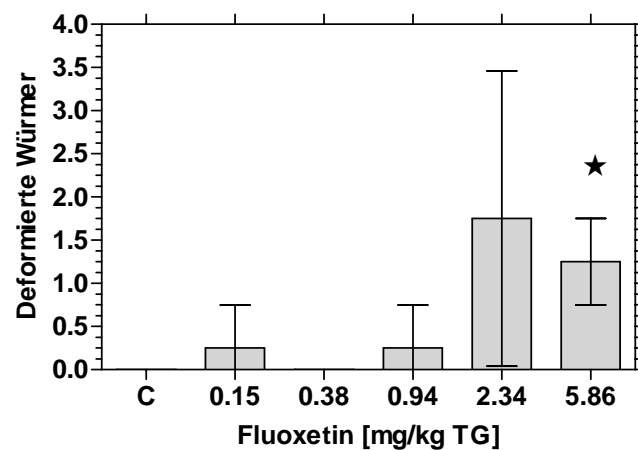
B): Zahl der ausgewachsenen Würmer

C): Zahl der neugebildeten Würmer

D): Biomasse pro Wurm

One-Way-Anova mit Dunnett's Multiple Comparison Test; ★ =  $p < 0,05$ , ★★ =  $p < 0,01$ . Je 3 Replikate.

Mehrfach wurden bei der Auswertung auch deformierte Würmer gefunden. In den Konzentrationsstufen 2,34 und 5,86 mg/kg TG waren zwischen einem und vier deformierte Würmer pro Ansatz enthalten. In den niedrigeren Konzentrationen wurden nur vereinzelt deformierte Würmer gefunden, in der Kontrolle nicht. Die Zahl der deformierten Würmer war lediglich in der Behandlungsstufe 5,86 mg/kg TG signifikant von der Kontrolle verschieden (Abb. 3.46).



**Abb. 3.46:** Reproduktionstest mit *Lumbriculus variegatus*. Testsubstanz Fluoxetin  
Deformierte Würmer  
One-Way-Anova mit Dunnett's Multiple Comparison Test; ★ =  $p < 0,05$ . Je 3 Replikate.

In der Konzentrationsstufe 5,86 mg/kg TG fielen Würmer auf, deren Darm nur lückenhaft mit Nahrung gefüllt war. Die Würmer waren relativ blass, ihre Bewegungen nicht zielgerichtet (Abb. 3.47).



**Abb. 3.47:** Reproduktionstest mit *Lumbriculus variegatus*. Lückenhaft gefüllter Magen-Darmtrakt, Beobachtet in der Behandlungsstufe 5,86 mg/kg TG (Aufnahme aus HECKER 2004)

### 3.4 Destruentenmikrokosmos

Folgende Parameter wurden erhoben:

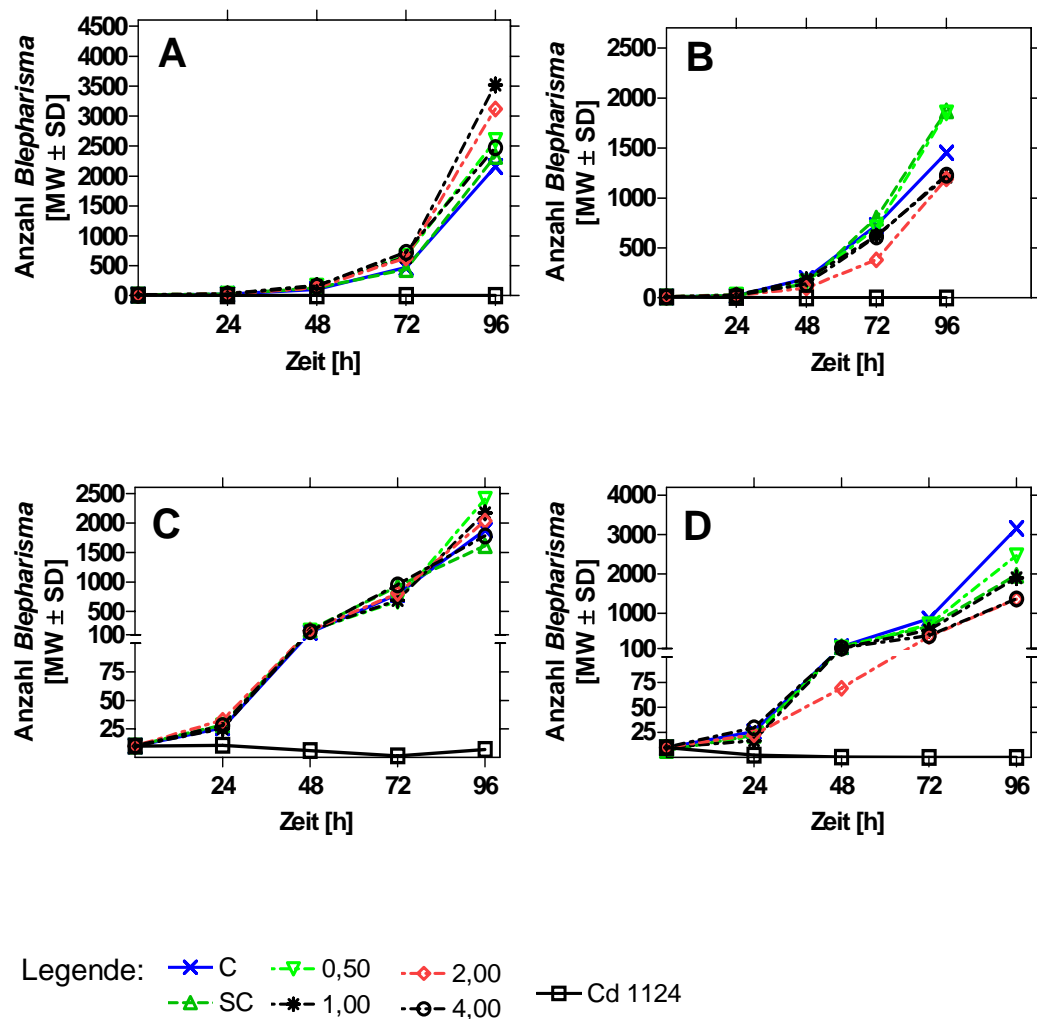
- Anzahlen von *Blepharisma japonicum* zu den Zeitpunkten  $t_{24}$ ,  $t_{48}$ ,  $t_{72}$  und  $t_{96}$
- Zelldichte von *Tetrahymena thermophila* zu den Zeitpunkten  $t_{24}$ ,  $t_{48}$ ,  $t_{72}$  und  $t_{96}$
- Generationszeiten von *Blepharisma japonicum*

## 3.4.1 Carbamazepin

Folgende Testkonzentrationen wurden verwendet: 0,50, 1,00, 2,00 und 4,00 µg/l. Cadmium als Positivkontrolle wurde in einer Konzentration von 1024 µg/l (= 10 µMol) benutzt.

- *Blepharisma*

Die Versuche wurden am 15.07.2004, 16.08.2004, 30.08.2004 und 13.09.2004 begonnen und dauerten jeweils fünf Tage. Zu Versuchsbeginn wurden pro Versuchsansatz zehn *Blepharisma* und 100 µl *Tetrahymena*-Suspension eingesetzt. Die Zellzahlen von *Blepharisma* und der Vermehrungsverlauf sind in Abbildung 3.48 dargestellt.



**Abb. 3.48:** Mikrokosmos-Test mit *Blepharisma japonicum* und *Tetrahymena thermophila*. Testsubstanz Carbamazepin. Zahl von *Blepharisma* in Kontrolle und allen Behandlungsstufen. n = 3.  
 A: Versuchsbeginn 15.07.2004, B: Versuchsbeginn 16.08.2004, C: Versuchsbeginn 30.08.2004, D: Versuchsbeginn 13.09.2004

Verschiedentlich ergeben sich signifikante Unterschiede von einzelnen Ansätzen gegenüber der Lösemittelkontrolle. Sie sind in Tabelle 3.15 zusammengefasst. Keine dieser Differenzen ist in einer der folgenden Wiederholungen reproduzierbar. Auffällig sind stark schwankende Reproduktionsraten innerhalb der Versuchswiederholungen. Während in der Wiederholung D nach 96 Stunden bis zu 4100 Tiere pro Ansatz gefunden werden, überschreitet die Anzahl in Wiederholung B 2500 Tiere nicht. In beiden Ansätzen vermehren sich die Tiere exponentiell, doch mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten. In Tabelle 3.16 sind die durchschnittlichen Generationszeiten aller Ansätze dargestellt

**Tabelle 3.15.** Mikrokosmos-Test mit *Blepharisma japonicum* und *Tetrahymena thermophila*. Testsubstanz: Carbamazepin. Behandlungsstufen mit signifikant zur Lösemittelkontrolle verschiedenen *Blepharisma*-Zahlen (One-Way-Anova mit Dunnett's Multiple-Comparison-Test).

zur Lösemittelkontrolle verschiedene Behandlungsstufen und Signifikanzniveau				
	t <sub>24</sub>	t <sub>48</sub>	t <sub>72</sub>	T <sub>96</sub>
Versuch A	4,00 µg, p < 0,01	_____	_____	_____
Versuch B	_____	_____	2,00 µg, p < 0,05	_____
Versuch C	_____	_____	_____	0,50 µg, p < 0,05
Versuch D	4,00 µg, p < 0,05	alle bei p < 0,05, nur 2,00 µg bei p < 0,01	_____	_____

In der Positivkontrolle sind lediglich in Wiederholung C zur Zählung am vierten Tag noch einige *Blepharisma* vorhanden, in den übrigen Ansätzen sterben alle eingesetzten Tiere binnen 24 Stunden. Für die Positivkontrolle wurde daher keine Generationszeit berechnet.

**Tabelle 3.16.** Mikrokosmos-Test mit *Blepharisma japonicum* und *Tetrahymena thermophila*. Testsubstanz: Carbamazepin. Generationszeiten von *Blepharisma japonicum*.

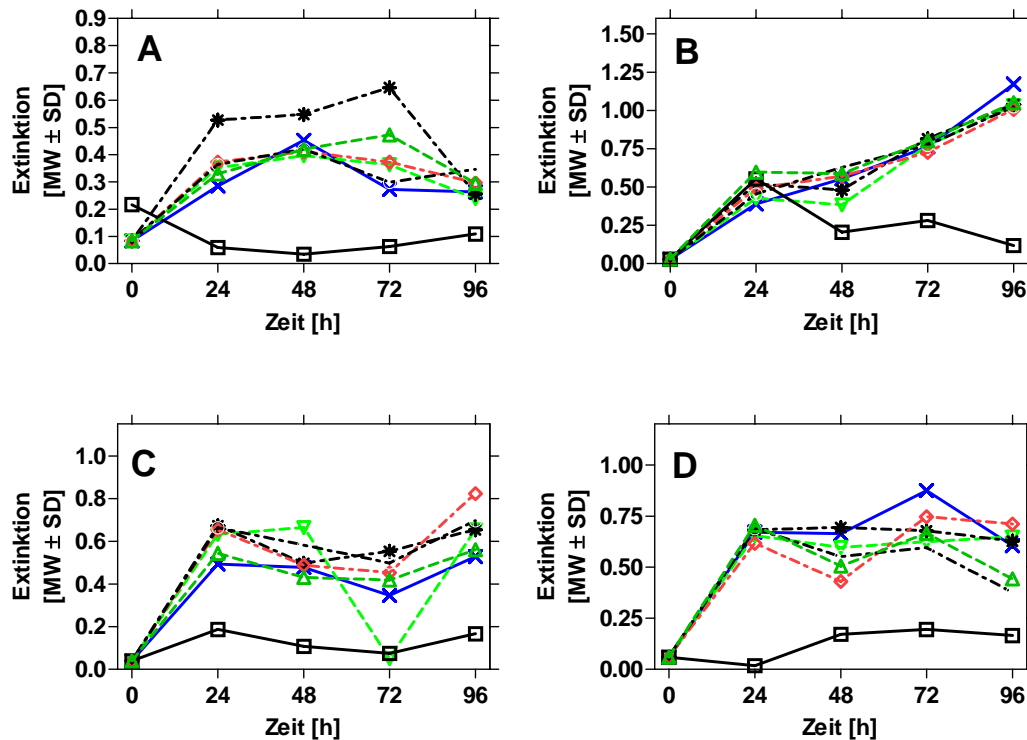
Testkonzentration [µg/l]	Generationszeiten [h]			
	Versuch A	Versuch B	Versuch C	Versuch D
C	11,0	19,0	16,3	12,3
SC	10,2	16,5	20,1	14,4
0,50	12,1	15,6	12,9	12,7
1,00	9,90	19,7	14,0	13,3
2,00	10,4	14,1	15,9	13,2
4,00	13,2	18,7	18,9	14,1

Es zeigt sich, dass die verschiedenen Behandlungsstufen merklich unterschiedliche Generationszeiten aufweisen. Deren Verteilung ist jedoch in den Wiederholungen durchweg verschieden. So zeigt die höchste Testkonzentration in den verschiedenen Wiederholungen einmal die längste Generationszeit, einmal die zweitlängste und zweimal Werte im Mittelfeld. Die Behandlungsstufe mit der kürzesten Generationszeit ist von Versuch zu Versuch unterschiedlich, ebenso die Stellung der Kontrollen in der entsprechenden Rangabfolge. Die Unterschiede in Zellzahl und Generationszeit sind augenscheinlich in unterschiedlichen Wachstumsphasen der Ausgangskulturen von *Blepharisma* zum Versuchsstart begründet.



- *Tetrahymena*

Die Zelldichten wurden photometrisch über die Extinktion bei einer Wellenlänge von 540 nm bestimmt. Diese Werte und ihr Verlauf über die Versuchsdauer sind in Abbildung 3.49 aufgetragen. Die Standardabweichungen sind der besseren Übersichtlichkeit halber nicht wiedergegeben.



Legende:   
 C (blau mit Kreuzen)   
 SC (grün mit Dreiecken)   
 0,50 (grün gestrichelt mit Kreisen)   
 1,00 (schwarz gestrichelt mit Sternen)   
 2,00 (rot gestrichelt mit Kreisen)   
 4,00 (schwarz gestrichelt mit Kreisen)   
 Cd 1124 (durchgezogene Linie mit Quadraten)

**Abb. 3.49:** Mikrokosmos-Test mit *Blepharisma japonicum* und *Tetrahymena thermophila*. Testsubstanz Carbamazepin. Zelldichten von *Tetrahymena* in Kontrolle und allen Behandlungsstufen. n = 3. A: Versuchsbeginn 15.07.2004, B: Versuchsbeginn 16.08.2004, C: Versuchsbeginn 30.08.2004, D: Versuchsbeginn 13.09.2004

Es zeigt sich, dass außer in Wiederholung B die Zelldichten nur bis zum Zeitpunkt  $t_{24}$  ansteigen und dann nur noch geringfügig schwanken. Die überall relativ gleichen Wachstumsraten bei *Tetrahymena* erklären sich mit dem gleichen Alter der Kulturen; es wurden immer 72 Stunden alte Kulturen benutzt. Zwar zeigen sich einzelne signifikante Unterschiede der Zelldichten zur Lösemittelkontrolle (der besseren Übersichtlichkeit wegen nicht dargestellt), doch sind diese nicht reproduzierbar und erscheinen von Fall zu Fall verschieden. Am deutlichsten wird dies an der *Tetrahymena*-Dichte in Wiederholung A, Behandlungsstufe 1,00 µg/l. Die Kurve zeigt eine gegenüber allen anderen Behandlungsstufen sichtlich erhöhte Zelldichte an, zu den Auswertungen nach 24 und 48 Stunden ist der Unterschied signifikant (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple-Comparison-Test,  $p < 0,01$  bzw.  $p < 0,05$ ). Diese Signifikanz verliert sich jedoch bei den beiden folgenden Auswertungen und ist in keiner der übrigen Versuchswiederholungen reproduzierbar. Weitere festgestellte Unterschiede wiederholen sich ebenfalls nicht, dafür treten dann andere auf, die aber nie eine Konzentrations-

Wirkungsbeziehung erkennen lassen. In der Positivkontrolle zeigt sich in den Wiederholungen A und D ein Absinken der Zelldichte gegenüber dem Nullwert, gefolgt von einem leichten Anstieg während der weiteren Versuchsdauer. In den Wiederholungen B und C ist der Verlauf uneinheitlich, am Ende werden auch hier höhere Zelldichten als zu Beginn gemessen.

### 3.4.2 Clofibrinsäure

#### - *Blepharisma*

Folgende Konzentrationen wurden getestet: 0,05, 0,10, 0,20 und 0,40 µg/l. Als Positivkontrolle diente erneut Cadmium, diesmal in einer Konzentration von 562 µg/l (= 5 µMol). Wie auch bei den Versuchen mit Carbamazepin zeigen sich in allen drei Wiederholungen des Tests mit Clofibrinsäure unterschiedliche Zellzahlen und Generationszeiten. Der Verlauf der Vermehrung von *Blepharisma* ist in Abbildung 3.50 dargestellt.

Vereinzelt treten signifikante Unterschiede auf, so zum Beispiel in Wiederholung A, Zeitpunkt  $t_{72}$ , wo alle Behandlungsstufen signifikant verschieden zur Lösemittelkontrolle sind (One-Way-Anova mit Dunnett's Multiple-Comparison-Test,  $p < 0,01$ ). Diese Unterschiede verlieren sich jedoch bei der Auswertung  $t_{96}$  wieder. Weitere auftretende Unterschiede sind ebenfalls stets bei der nächsten Auswertung nicht mehr auszumachen und auch in den Wiederholungen nicht reproduzierbar. Tabelle 3.17 gibt einen Überblick.

**Tabelle 3.17.** Mikrokosmos-Test mit *Blepharisma japonicum* und *Tetrahymena thermophila*. Testsubstanz: Clofibrinsäure. Behandlungsstufen mit signifikant zur Lösemittelkontrolle verschiedenen *Blepharisma*-Zahlen (One-Way-Anova mit Dunnett's Multiple-Comparison-Test).

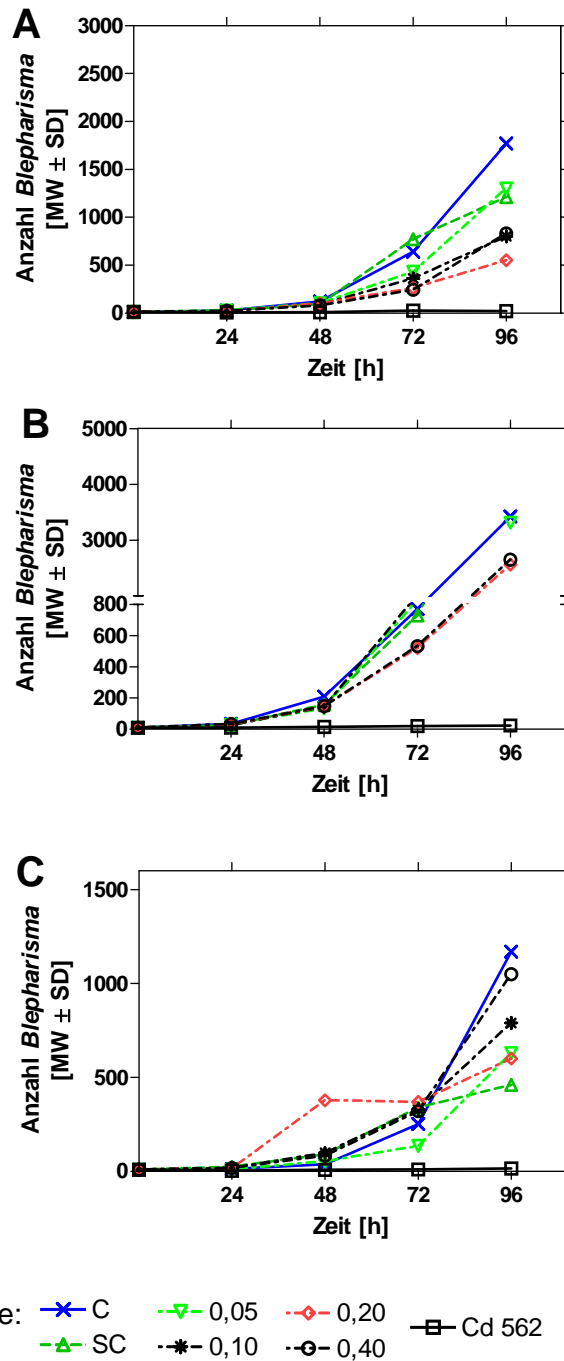
zur Lösemittelkontrolle verschiedene Behandlungsstufen und Signifikanzniveau				
	$t_{24}$	$t_{48}$	$t_{72}$	$t_{96}$
Versuch A	0,20 ng, $p < 0,05$	_____	alle mit $p < 0,01$	_____
Versuch B	C, $p < 0,05$	_____	_____	_____
Versuch C	C, 0,05 ng ( $p < 0,01$ ), 0,20 ng ( $p < 0,05$ )	C ( $p < 0,01$ ), 0,05 ng ( $p < 0,05$ )	_____	C ( $p < 0,05$ )

Hier liegen die in Kolonien von *Blepharisma* üblichen Wachstumsschwankungen vor. In der Positivkontrolle ist eine tendenzielle Anpassung der *Blepharisma* an das Cadmium zu beobachten. In den ersten drei Auswertungen finden sich in allen Wiederholungen kaum weniger *Blepharisma* als zu Beginn, am letzten Tag ist sogar eine Vermehrung zu sehen.

Tabelle 3.18 gibt einen Überblick über die Generationszeiten in den einzelnen Wiederholungen.

**Tabelle 3.18.** Mikrokosmos-Test mit *Blepharisma japonicum* und *Tetrahymena thermophila*. Testsubstanz: Clofibrinsäure. Generationszeiten von *Blepharisma japonicum*

Testkonzentration [µg/l]	Generationszeiten [h]		
	Versuch A	Versuch B	Versuch C
C	14,9	11,3	10,7
SC	20,6	15,9	25,2
0,05	14,4	11,7	11,4
0,10	17,8	16,6	17,3
0,20	19,7	10,7	32,4
0,40	13,7	10,6	13,7
Cd 562	56,0	63,5	71,8



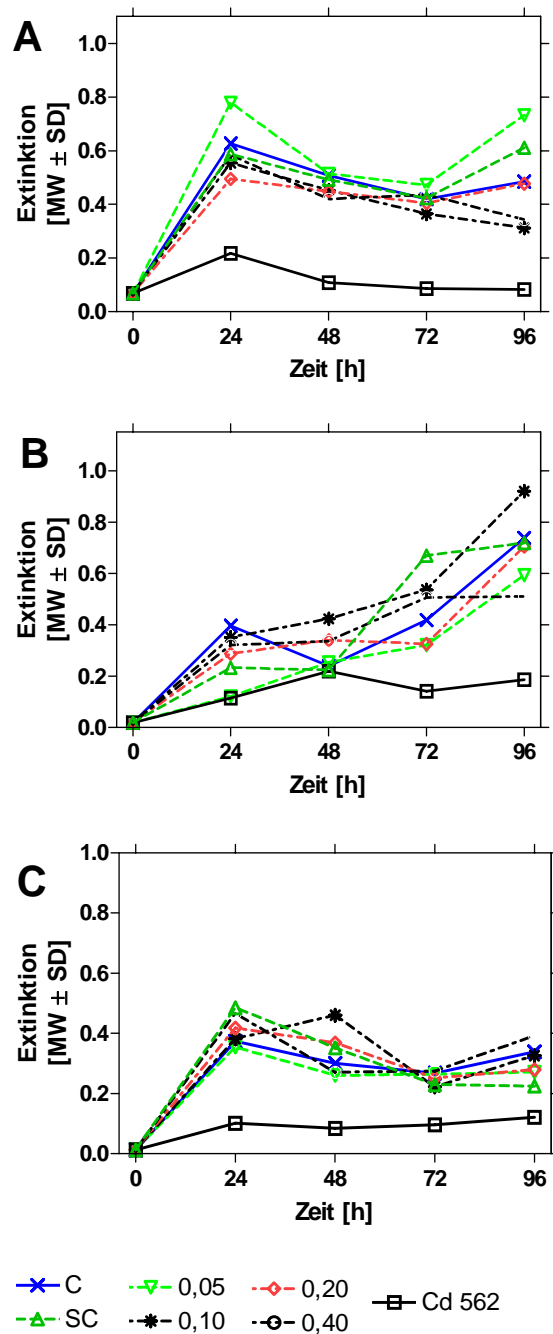
**Abb. 3.50:** Mikrokosmos-Test mit *Blepharisma japonicum* und *Tetrahymena thermophila*. Testsubstanz: Clofibrinsäure. Zahlen von *Blepharisma* in Kontrolle und allen Behandlungsstufen. n = 3. A: Versuchsbeginn 19.09.2004, B: Versuchsbeginn 07.11.2004, C: Versuchsbeginn 13.12.2004

Die Generationszeiten lassen keine eindeutige Tendenz erkennen. Kontrolle und Lösemittelkontrolle liegen in allen Wiederholungen an verschiedenen Stellen in der Rangfolge, in jeder Wiederholung hat eine andere Behandlungsstufe die längste Generationsdauer. Aufgrund der Reduzierung der Cadmiumkonzentration in der Positivkontrolle überlebten im Gegensatz zu den Versuchen mit Carbamazepin genug *Blepharisma*, um auch hier eine Generationszeit berechnen zu können. Diese ist – das ist als einziges durch alle Wiederholungen kon-

stantes Ergebnis zu verzeichnen – stets deutlich höher als die der anderen Behandlungsstufen.

- *Tetrahymena*

Wie in den Versuchen mit Carbamazepin, so zeigt sich auch diesen Versuchen in zwei von drei Wiederholungen ein steiler Anstieg der Zelldichte in den ersten 24 Stunden, anschließend bleibt die Dichte weitgehend konstant (Abb. 3.51). Die Standardabweichungen sind der besseren Übersichtlichkeit halber nicht wiedergegeben.



**Abb. 3.51:** Mikrokosmos-Test mit *Blepharisma japonicum* und *Tetrahymena thermophila*. Testsubstanz: Clofibrinsäure. Zelldichten von *Tetrahymena* in Kontrolle und allen Behandlungsstufen. n = 3  
 A: Versuchsbeginn 19.09.2004, B: Versuchsbeginn 07.11.2004, C: Versuchsbeginn 13.12.2004

Eine Abweichung ist lediglich in Wiederholung B festzustellen, in der die Zelldichte bis zum Testende weiter ansteigt. Verschiedene signifikante Unterschiede in den Zelldichten sind zu verzeichnen. Sie sind jedoch weder in den Wiederholungen des Versuchs, noch von Auswertung zu Auswertung reproduzierbar. Insgesamt betrachtet sind die Zelldichten etwas geringer als in den Carbamazepinversuchen, innerhalb der Wiederholungen jedoch vergleichbar.

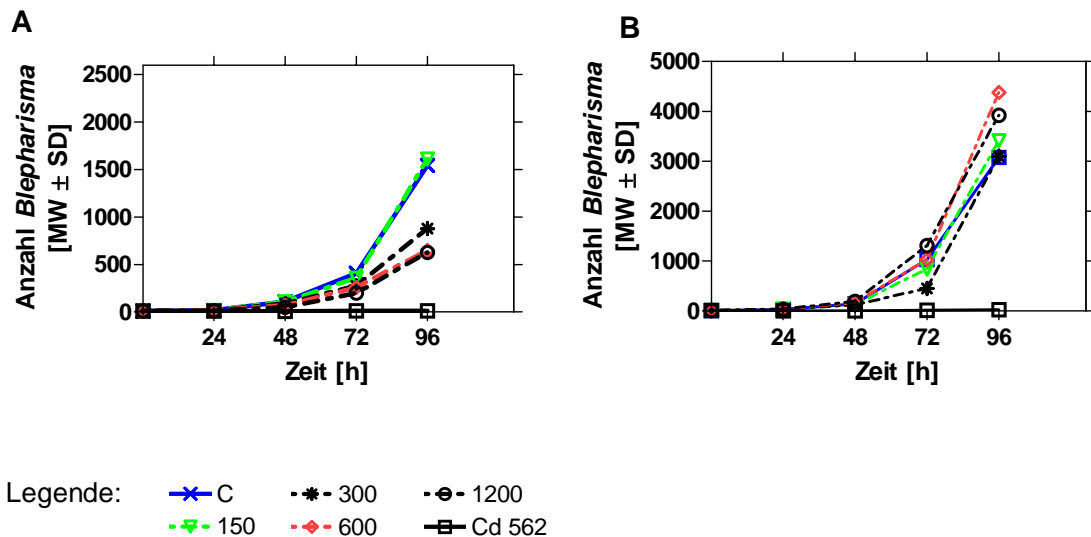
In der Positivkontrolle steigt die Zelldichte in den Wiederholungen B und C gegenüber der Ausgangsdichte leicht an. In Wiederholung C erfolgt dies von Beginn an, in Wiederholung B ist zu Beginn ein deutlicher Anstieg mit anschließendem Rückgang zu verzeichnen, die resultierende Dichte ist jedoch immer noch höher als zu Beginn. Wiederholung A zeigt einen ähnlichen Trend.

### 3.4.3 Ciprofloxacin

Folgende Konzentrationen wurden getestet: 150 ng/l, 300 ng/l, 600 ng/l und 1200 ng/l. Als Positivkontrolle diente Cadmium (562 µg/l).

#### - *Blepharisma*

Wie Abbildung 3.52 und Tabelle 3.19 zeigen, sind im ersten Testdurchgang (Versuch A) in der Behandlungsstufe 1200 ng/l bei den Auswertungen  $t_{24}$  und  $t_{48}$  signifikant weniger *Blepharisma* vorhanden als in der Kontrolle, in der Auswertung  $t_{48}$  außerdem in der Behandlungsstufe 600 ng/l.



**Abb. 3.52:** Mikrokosmos-Test mit *Blepharisma japonicum* und *Tetrahymena thermophila*. Testsubstanz: Ciprofloxacin. Anzahl von *Blepharisma* in Kontrolle und allen Behandlungsstufen.  $n = 3$ .

A: Versuchsbeginn 04.10.2004, B: Versuchsbeginn 19.12.2004

Wiederholung B kann dieses Ergebnis jedoch nicht bestätigen. Die Verhältnisse sind dort sichtlich verschieden, mit durchschnittlich 3080 Tieren bei der Auswertung  $t_{96}$  befinden sich die Zahlen der Kontrollansätze auf einem mittleren Rang. Die Behandlungsstufe 600 ng/l weist mit 4380 die meisten Tiere auf, die nächst höhere Anzahl befindet sich in der Behandlungsstufe 1200 ng/l mit 3920. Tabelle 3.19 stellt die vorhandenen Unterschiede zusammen.

In der Positivkontrolle gehen die *Blepharisma*-Zahlen in beiden Ansätzen zunächst stark zurück, gegen Ende kann eine Zunahme beobachtet werden. Während in Wiederholung gegen Ende eine geringe Zunahme der *Blepharisma*-Zahl zu verzeichnen ist, stagnieren die Zahlen in Wiederholung A auf dem Niveau zu Versuchsbeginn.

**Tabelle 3.19.** Mikrokosmos-Test mit *Blepharisma japonicum* und *Tetrahymena thermophila*. Testsubstanz: Ciprofloxacin. Behandlungsstufen mit signifikant zur Lösemittelkontrolle verschiedenen *Blepharisma*-Zahlen (One-Way-Anova mit Dunnett's Multiple-Comparison-Test)

zur Lösemittelkontrolle verschiedene Behandlungsstufen und Signifikanzniveau				
	t <sub>24</sub>	t <sub>48</sub>	t <sub>72</sub>	t <sub>96</sub>
Versuch A	300 ng, 1200 ng, p < 0,01	600 ng, 1200 ng, p < 0,01		
Versuch B		1200 ng (p < 0,05)	300 ng (p < 0,01)	600 ng, p < 0,05

Erneut sind die Reproduktionsraten im Testdurchgang B in allen Behandlungsstufen deutlich höher als in Durchgang A, es sind überall doppelt so viele oder mehr Tiere vorhanden. Die Generationszeiten schwanken von Wiederholung zu Wiederholung stark (Tab. 3.20).

**Tabelle 3.20.** Mikrokosmos-Test mit *Blepharisma japonicum* und *Tetrahymena thermophila*. Testsubstanz: Ciprofloxacin. Generationszeiten von *Blepharisma japonicum*

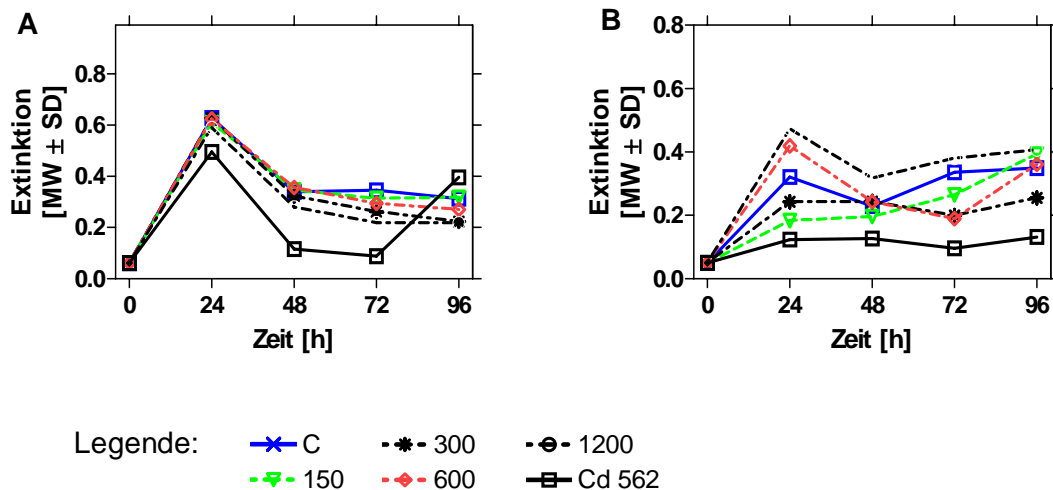
Testkonzentration [ng/l]	Generationszeiten [h]	
	Versuch A	Versuch B
C	12,5	13,9
150	11,2	11,5
300	14,2	8,77
600	16,6	11,3
1200	14,0	13,9
Cd 562	288	23,1

Wie zu erwarten, weisen Kontrolle und die Behandlungsstufe 150 ng/l im Versuch A die niedrigsten Generationszeiten auf, die Behandlungsstufen 600 und 1200 ng/l haben eine deutlich höhere Replikationsdauer. Somit zeigen die Generationszeiten ein den absoluten Dichten ähnliches Bild. Entsprechend verhalten sich die Daten in Versuch B. Hier hat die Behandlungsstufe 600 ng/l, in der die meisten Tiere gezählt werden, eine deutlich kürzere Generationsdauer als die Kontrolle. Die noch geringere Reproduktionsdauer in der Behandlungsstufe 300 ng/l ist verständlich, wenn man den sehr starken Anstieg der *Blepharisma*-Anzahl besonders von t<sub>72</sub> nach t<sub>96</sub> beachtet. Gegenüber der vorangegangenen Auswertung sind die Dichten extrem gestiegen, in einem Replikat mehr als zehnfach.

#### - *Tetrahymena*

Die Zelldichten verhalten sich anders als in den vorangegangenen Versuchen. Wie Abbildung 3.53 zeigt, steigen die Zelldichten im Versuch A bei der Auswertung t<sub>24</sub> zunächst gegenüber dem Nullwert an. Die Werte bleiben jedoch nicht konstant, sondern fallen um 0,2 Extinktionseinheiten ab. Erst ab der Auswertung t<sub>48</sub> bleibt die Zelldichte in allen Ansätzen auf konstantem Niveau. Der Anstieg in der Positivkontrolle zum Zeitpunkt t<sub>24</sub> ist vermutlich durch Verunreinigung der Proben mit Detritus bedingt, genau wie zur Auswertung t<sub>96</sub>. In beiden Wiederholungen ist jedoch - auch bei Berücksichtigung der Verunreinigung - ein Anstieg der Zelldichte gegenüber dem Versuchsbeginn festzustellen.

In Versuch B erreichen die Zelldichten erneut zum Zeitpunkt  $t_{24}$  das bis zum Versuchsende im wesentlichen gleiche Niveau. Allerdings liegen die Zelldichten der einzelnen Behandlungsstufen deutlich weiter auseinander, in früheren Ansätzen verliefen die einzelnen Kurven dichter zusammen. Die Zelldichten der Positivkontrolle bewegen sich erneut deutlich unter dem Niveau der übrigen Ansätze, sie sind durchweg geringer als in der Kontrolle. Bei den Zelldichten der mit Ciprofloxacin belasteten Ansätze zeigen sich vereinzelt signifikante Differenzen (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple-Comparison-Test,  $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,01$ ), die jedoch nur bei einzelnen Auswertungen auftreten und nicht während der ganzen Versuchsdauer. Dies ist auch in Auswertung A der Fall. In Abbildung 3.53 sind die Standardabweichungen der besseren Übersichtlichkeit halber nicht wiedergegeben.



**Abb. 3.53:** Mikrokosmos-Test mit *Blepharisma japonicum* und *Tetrahymena thermophila*. Tests substanz: Ciprofloxacin. Zelldichten von *Tetrahymena* in Kontrolle und allen Behandlungsstufen.  $n = 3$ . A: Versuchsbeginn 04.10.2004, B: Versuchsbeginn 19.12.2004

#### 3.4.4 Fluoxetin

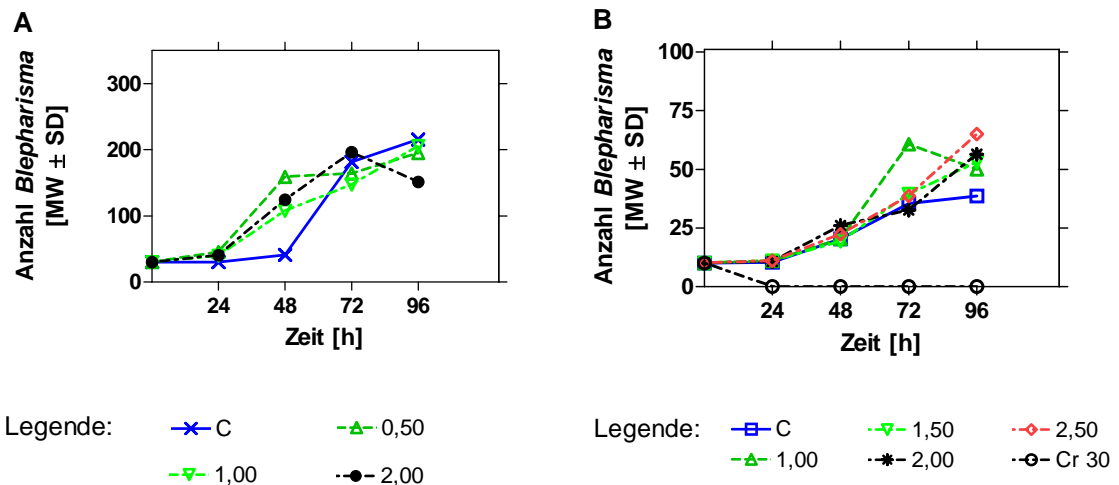
Die Versuche wurden im Rahmen einer Diplomarbeit von HECKER (2004) durchgeführt. Im ersten Versuch wurden folgende Konzentrationen getestet: 0,50, 1,00 und 2,00 µg/l. Im zweiten Versuch wurde der Konzentrationsbereich variiert, um auch höhere Konzentrationen zu prüfen, hier wurden die folgenden Konzentrationen untersucht: 1,00, 1,50, 2,00 und 2,50 µg/l. Außerdem wurde hier als Positivkontrolle Chrom in einer Konzentration von 30 µg/l verwendet.

##### - *Blepharisma*

Im Vergleich mit den vorangegangenen Versuchen fällt die niedrige Zellzahl ins Auge (Abb. 3.54). In Versuch A sind zum Zeitpunkt  $t_{96}$  maximal 261 *Blepharisma* in einem Replikat der Kontrolle festzustellen, in Versuch B sind es sogar maximal 71 Tiere (ein Replikat der Behandlungsstufe 1 µg/l). Die Zahlen zeigen jedoch keinen Einfluss von Fluoxetin, auch in der Kontrolle vermehrt sich *Blepharisma* nur äußerst langsam. In keinem der beiden Versuche weist eine der Behandlungsstufen signifikant von der Kontrolle verschiedene Werte auf (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple-Comparison-Test,  $p > 0,05$ ). Im Versuch A sind zur Auswertung  $t_{96}$  zwar mehr *Blepharisma* als in den behandelten Ansätzen zu finden, doch ist

der Unterschied nur gering. Auch die etwas stärker abweichenden Werte der Behandlungsstufe 2000 ng/l sind statistisch nicht signifikant verschieden.

Im Versuch B weist die Kontrolle hingegen mit durchschnittlich 38,7 Tieren die niedrigste Zellzahl auf, sämtliche behandelten Ansätze mit Ausnahme der hier erstmalig untersuchten Positivkontrolle enthalten mehr *Blepharisma*. Die Behandlungsstufe 2,5 µg/l enthält durchschnittlich 65 Tiere, dieser Wert ist statistisch signifikant (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple-Comparison-Test,  $p < 0,05$ ). Die Positivkontrolle zeigt die toxische Wirkung des Chrms: Vom ersten Auswertungstag an sind keine Blepharismen mehr festzustellen.



**Abb. 3.54:** Mikrokosmos-Test mit *Blepharisma japonicum* und *Tetrahymena thermophila*. Testsubstanz: Fluoxetin. Zahlen von *Blepharisma* in Kontrolle und allen Behandlungsstufen. N = 3.  
A: Versuchsbeginn 01.06.2004, B: Versuchsbeginn 05.07.2004

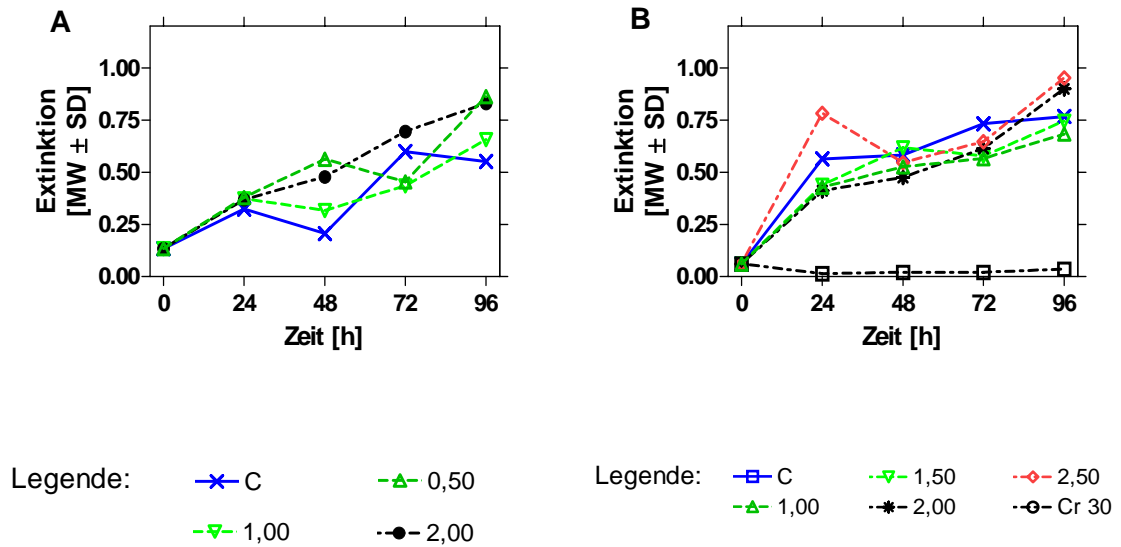
**Tabelle 3.21.** Mikrokosmos-Test mit *Blepharisma japonicum* und *Tetrahymena thermophila*. Testsubstanz: Fluoxetin. Generationszeiten von *Blepharisma japonicum*

Testkonzentration [µg/l]	Generationszeiten [h]	
	Versuch A	Versuch B
C	29,9	46,9
0,50	49,5	
1,00	38,7	42,4
1,50		36,1
2,00	54,0	35,9
2,50		31,2

Die Generationszeiten (Tab. 3.21) in beiden Versuchen sind gegenüber den Werten der anderen Versuche deutlich verlängert. Sie entsprechen jedoch den ermittelten Zellzahlen. Im Versuch A zeigt die Kontrolle die kürzeste, die Behandlungsstufe 2,0 µg/l die längste Generationszeit, entsprechend den dort vorgefundenen höchsten beziehungsweise niedrigsten Zellzahlen. Auch die weiteren Generationszeiten passen zu den in den Ansätzen ermittelten Tierzahlen. Gleiches gilt für Versuch B, hier weist umgekehrt die Behandlungsstufe 2,5 µg/l die kürzeste, die Kontrolle die höchste Generationsdauer auf. Auch dies entspricht den vorgefundenen Zellzahlen. Für die übrigen Behandlungsstufen finden sich ähnliche Werte. Die ermittelten Generationszeiten sind für *Blepharisma* nicht ungewöhnlich (GIESE 1973). Für die Positivkontrolle in Versuch B konnte aufgrund der sehr wenigen vorgefundenen *Blepharisma* keine realistische Generationszeit berechnet werden.



- *Tetrahymena*



**Abb. 3.55:** Mikrokosmos-Test mit *Blepharisma japonicum* und *Tetrahymena thermophila*. Testsubstanz: Fluoxetin. Zelldichten von *Tetrahymena* in Kontrolle und allen Behandlungsstufen. n = 3.  
A: Versuchsbeginn 01.06.2004, B: Versuchsbeginn 05.07.2004

Die Betrachtung der Zelldichte lässt signifikante Differenzen erkennen (Abb. 3.55). Bei der Auswertung  $t_{48}$  sind in sämtlichen Behandlungsstufen höhere Zelldichten als in der Kontrolle festzustellen (One-Way-Anova mit Dunnett's Multiple-Comparison-Test,  $p < 0,01$ ). Zum Zeitpunkt  $t_{72}$  zeigen die Behandlungsstufen 0,5 und 1,0 µg/l signifikante Unterschiede (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple-Comparison-Test,  $p < 0,05$ ). Zum Zeitpunkt  $t_{96}$  sind die Werte der Behandlungsstufen 0,5 und 2,0 µg/l erneut gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple-Comparison-Test,  $p < 0,001$ ).

In Versuch B zeigen sich bis auf die bei der Auswertung an  $t_{72}$  erhobenen Werte keine signifikanten Differenzen. Nur zu dieser Auswertung sind die Zelldichten der Behandlungsstufen 1000, 1500 und 2000 ng/l signifikant geringer als die Zelldichte der Kontrolle (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple-Comparison-Test,  $p < 0,01$  bzw.  $p < 0,05$ ). In der Positivkontrolle ist nur eine sehr geringe Extinktion messbar.

### 3.5 Rückstandsanalytik

#### a) Carbamazepin

Tab. 3.22 zeigt die im Sediment des Lebenszyklustests mit *C. riparius*, Serie I am Tag 0 und am Tag 28 im Sediment messbaren Carbamazepinkonzentrationen. Dargestellt sind außerdem die Konzentrationen zu Versuchsbeginn als Prozentzahlen der Nominalkonzentrationen sowie die Endkonzentrationen als Prozentzahlen der Ausgangskonzentration.

**Tabelle 3.22.** 30-Tage-Sedimenttoxizitätstest mit *Chironomus riparius* (Serie I). Gemessene Carbamazepinkonzentrationen an Tag 0 und Tag 28 im Sediment sowie Verhältnis der End- zur Ausgangskonzentration (Bestimmungsgrenze im Wasser: 2 ng/l; im Sediment: 2 µg/kg TG)

Nominalkonzentration [mg/kg TG]	gemessene Konzentration		Anteil der gemessenen Konzentrationen im Vergleich zur Nominalkonzentration bei Versuchsbeginn [%]	Anteil der am Versuchsende gemessenen Konzentrationen im Vergleich zur bei Versuchsbeginn gemessenen Konzentration [%]
	Sediment Versuchsbeginn [mg/kg TG]	Sediment Versuchsende [mg/kg TG]		
C	<BG	n. d.	--	--
SC	<BG	n. d.	--	--
0,16	0,02	0,01	11,2	27,8
0,8	0,03	0,07	4,13	218
4	0,22	0,24	5,50	109
20	1,65	1,46	8,25	88,5
100	8,24	5,64	8,24	68,5

In der Behandlungsstufe 0,16 mg/kg ist zum Versuchsende nur noch ein geringer Anteil der Ausgangskonzentration nachweisbar, während in allen anderen Ansätzen zwischen 68 und 218% der Ausgangskonzentration vorliegen.

Tab. 3.23 zeigt die am Tag 0 (Einsatz der Larven) gemessenen Carbamazepinkonzentrationen in Sediment und Überstandswasser des Tests mit *Chironomus riparius*, Serie III. Während in Kontrolle und Lösemittelkontrolle kein Carbamazepin gefunden wird, reichen die Konzentrationen in den behandelten Sedimenten von 0,14 bis 2,9 mg/kg Carbamazepin; 14% bis 29% der Nominalkonzentrationen. Zu Versuchsende sind zwischen 38 und 57% des eingesetzten Carbamazepins im Versuchssystem vorhanden.

**Tabelle 3.23.** 30-Tage-Sedimenttoxizitätstest mit *Chironomus riparius* (Serie III). Gemessene Carbamazepinkonzentrationen an Tag 0 in Sediment und Überstandswasser (Bestimmungsgrenze im Wasser: 2 ng/l; im Sediment: 2 µg/kg TG)

Nominalkonzentration [mg/kg TG]	gemessene Konzentration		% der Nominalkonzentration im Sediment	Summe der Wiederfindungsraten [%]
	Sediment [mg/kg TG]	Überstandswasser [mg/L]		
C	n. d.	n. d.		
SC	n. d.	n. d.		
0,625	0,14	0,16	22,4	48,6
1,25	0,23	0,33	18,7	45,3
2,5	0,47	0,61	18,7	42,9
5	0,72	1,22	14,4	38,8
10	2,90	2,85	29,0	57,5

#### b) Clofibrinsäure

Nach LÖFFLER (PERS. MITTEILUNG 2005) bindet Clofibrinsäure bei den im Versuch herrschenden pH-Werten nicht an Sedimente. Aufgrund dieser Tatsache und da nirgends Effekte dieser Substanz feststellbar waren, wurden lediglich Proben des Überstandswassers aus dem Lebenszyklustest mit *C. riparius* auf ihren Clofibrinsäuregehalt untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.24 dargestellt.

Es treten überall Wiederfindungsraten zwischen 81,6% und 120% auf. Die Konzentration der Testsubstanz bleibt über die Versuchsdauer im Wesentlichen konstant.

**Tabelle 3.24.** 30-d-Sedimenttoxizitätstest mit *Chironomus riparius* (Serie III). Gemessene Clofibrinsäurekonzentrationen am Tag 0 im Überstandswasser (Bestimmungsgrenze im Wasser: 2 ng/l; im Sediment: 2 µg/kg TG)

Nominalkonzentration [mg/kg TG]	gemessene Konzentration				
	resultierende Nominalkonzentration [mg/l], eingesetzt: 400 ml Wasser	Überstandswasser [mg/L], t <sub>0</sub>	Überstandswasser [mg/L], t <sub>30</sub>	Wiederfindungsrate t <sub>0</sub> [%]	Wiederfindungsrate t <sub>30</sub> [%]
C	--	--	--	--	--
SC	--	--	--	--	--
0,1	0,03	0,02	0,02	94,8	81,6
0,3	0,08	0,08	0,06	104	86,0
0,9	0,23	0,23	0,42	102	188
2,7	0,68	0,63	0,81	93,2	120
8,1	2,03	1,78	1,86	87,9	91,9

c) Ciprofloxacin

Bei der Analyse fanden sich nur noch Spuren von Ciprofloxacin; die Konzentrationen waren zu gering, um quantifiziert zu werden. Die Ergebnisse ermöglichen keine Aussage, in welchem Maße Ciprofloxacin bioverfügbar war.

d) Fluoxetin

Tab. 3.25 zeigt die gemessenen Fluoxetinkonzentrationen im Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum* direkt nach einem Wasserwechsel sowie 24, 48 und 72 Stunden später. Die Daten zeigen, dass kein merklicher Abbau stattfindet.

**Tabelle 3.25.** 30-Tage-Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*. Gemessene Fluoxetinkonzentrationen, direkt und 24, 48 und 72 h nach dem Wasserwechsel (Bestimmungsgrenze im Wasser: 1 µg/l)

Nominalkonzentration [µg/l]	Konzentrationen 72 h nach Wasserwechsel				
	gemessene Konzentration [µg/l]				Wiederfindungsrate an t <sub>72</sub> [%]
	t <sub>0</sub>	t <sub>24</sub>	t <sub>48</sub>	t <sub>72</sub>	
Kontrolle	2	0	0	0	--
3,2	3	2	2	2	66
16	12	12	11	11	68,8
80	65	66	33	58	72,5
400	363	317	341	345	86,3

Tab. 3.26 und 3.27 zeigen die Analyseergebnisse für Fluoxetin im Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*. Es ergeben sich recht geringe Wiederfindungsraten. Da das Sediment vor der Extraktion zentrifugiert wurde, wurde nur die absolute Konzentration im körnigen Sediment sowie im Überstandswasser bestimmt. Das Porenwasser wurde nicht untersucht.

**Tabelle 3.26.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*. Ermittelte Konzentrationen von Fluoxetin in Wasser und Sediment am Tag 0. (Bestimmungsgrenze: 1 µg/l in Wasser und Sedimentextrakt)

Nominelle Sediment- konzentration [mg/kg]	gemessene Konzentration [µg/l]		Wiederfindungsrate [% der Nominal- konzentration]
	Fluoxetin	Norfluoxetin	Fluoxetin
Wasserproben			
Kontrolle	--	--	--
0,15	--	--	--
0,38	3,00	--	0,80
0,94	9,00	--	1,00
2,34	29,0	--	1,20
5,86	130	--	2,21
Sedimentproben			
Kontrolle	1,00	--	--
0,15	53,0	--	35,3
0,38	91,0	3,00	24,0
0,94	217	4,00	23,1
2,34	423	9,00	18,1
5,86	1115	37,0	19,3

**Tabelle 3.27.** Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*. Ermittelte Konzentrationen von Fluoxetin in Wasser und Sediment am Tag 30 (Bestimmungsgrenze: 1 µg/l im Wasser und Sedimentextrakt).

Nominelle Sediment- konzentration [mg/kg]	gemessene Konzentration [µg/l]		Wiederfindungsrate [% der Nominalkon- zentration]
	Fluoxetin	Norfluoxetin	Fluoxetin
Wasserproben			
Kontrolle	--	--	--
0,15	--	--	--
0,38	--	--	--
0,94	1,00	--	0,1
2,34	6,00	--	0,3
5,86	18,0	--	0,3
Sedimentproben			
Kontrolle	--	--	--
0,15	13,0	--	8,70
0,38	45,0	3,00	11,8
0,94	158	9,00	16,8
2,34	278	17,0	11,9
5,86	734	63,0	12,5

### 3.6 Effektkonzentrationen

Anhand der analytisch bestimmten Substanzkonzentrationen konnten für Carbamazepin und Fluoxetin als charakteristische Daten die EC<sub>10</sub> und EC<sub>50</sub> sowie die NOEC und LOEC bestimmt werden. Die folgenden Tabellen 3.28 und 3.29 zeigen diese Toxizitätskennwerte.

## a) Carbamazepin

Die für *C. riparius* ermittelten Werte weichen nur in geringem Maß voneinander ab. Die Abweichungen in Serie IV erklären sich durch die erhöhte Versuchstemperatur, Serie II hat wegen der verlängerten Equilibrationsphase abweichende Werte.

Für die Risikobewertung wurde aus den ersten drei Versuchsserien eine durchschnittliche  $EC_{10}$  von 0,11 mg/kg bzw. 113 µg/kg Sediment (TG) berechnet. Die Serie IV wurde wegen der erhöhten Temperatur nicht in diese Berechnung mit einbezogen.

**Tabelle 3.28.** Toxizitätskenndaten für Carbamazepin im Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius*

Kennwert	Konzentration [mg/kg Sediment (TG)]			
	Serie I	Serie II	Serie III	Serie IV
NOEC	0,033	< 0,014	0,014	0,014
LOEC	0,22	0,14	0,234	0,234
$EC_{10}$	0,07	0,14	0,13	0,21
$EC_{50}$ (mit 95% - Konfidenzintervall)	0,16 (0,13-0,19)	0,19 (0,18-0,21)	0,21 (0,19-0,23)	0,28 (0,26-0,30)

## b) Fluoxetin

Der Wert für die LOEC liegt oberhalb der  $EC_{10}$  (Tabelle 3.30), da es der Wert ist, bei dem zum ersten Mal statistisch signifikante Effekte auftraten. Die übrigen Werte sind unauffällig und im Rahmen der Konzentrations-Wirkungsbeziehung plausibel. Zur Risikobewertung wurde die  $EC_{10}$  verwendet.

**Tabelle 3.29.** Toxizitätskenndaten für Fluoxetin im Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*

Kennwert	Konzentration [µg/l]
NOEC	0,47
LOEC	2,00
$EC_{10}$	0,81
$EC_{50}$ (mit 95% - Konfidenzintervall)	36,1 (6,93-188)

## 3.7 Akuttoxizität

Die akute Toxizität von Carbamazepin, Clofibrinsäure und Ciprofloxacin (Fluoxetin wurde nicht auf akute Toxizität getestet) wurde an *Chironomus riparius* und *Lumbriculus variegatus* getestet.

Die getesteten Konzentrationen für die einzelnen Substanzen sind in Tab. 3.30 dargestellt. Es wurden für *C. riparius* und *L. variegatus* die gleichen Testkonzentrationen verwendet. Nirgends wurde eine Akuttoxizität festgestellt (Tab. 3.31).

**Tabelle 3.30.** Test auf akute Toxizität mit *Chironomus riparius* und *Lumbriculus variegatus*.  
Testkonzentrationen

Substanz	Konzentrationsbereich [mg/l]
Carbamazepin	0,0005 - 4
Clofibrinsäure	0,00005 - 0,4
Ciprofloxacin	0,3 - 4,8

**Tabelle 3.31.** Test auf akute Toxizität mit *Chironomus riparius* und *Lumbriculus variegatus*.  
Ermittelte LOEC

Substanz	Versuchsorganismus	
	<i>Chironomus riparius</i> , Versuchsdauer: 24 h	<i>Lumbriculus variegatus</i> , Versuchsdauer: 96 h
Carbamazepin	> 4 mg/l	> 4,0 mg/l
Clofibrinsäure	> 0,4 mg/l	> 0,4 mg/l
Ciprofloxacin	> 4,8 mg/l	> 4,8 mg/l

## 4. Diskussion

### 4.1 Auswahl der Testsubstanzen

#### 4.1.1 Relevanz im Kontext der gesamten Arzneimittelfracht

Carbamazepin und Clofibrinsäure wurden als Testsubstanzen ausgewählt, da sie in zahlreichen Messungen in Umweltproben nachgewiesen wurden. So berichten FERRARI ET AL. (2004), HEBERER ET AL. (2002), TIXIER ET AL. (2003), WIEGEL ET AL. (2004) und TERNES (1998, 2001) über Carbamazepinfunde in Oberflächen- und Grundwässern. SACHER ET AL. (1998) fanden im Rhein mit 2,1 µg/l eine sehr hohe Carbamazepinkonzentration. Diese Konzentration beruhte auf Einleitung belasteter Abwässer, mittlerweile sind nicht mehr so hohe Einträge zu verzeichnen. Angesichts des ubiquitären Vorkommens dieser Substanz ist die Untersuchung möglicher Umwelteffekte geboten. Aufgrund der vielseitigen Anwendungen von Carbamazepin und der unverändert hohen Verordnungsraten ist ein Rückgang der Umweltkonzentrationen in absehbarer Zeit nicht zu erwarten. Eine Anreicherung des Pharmakons ist möglich, da die Substanz laut LÖFFLER ET AL. (2005) persistiert. Umso wichtiger ist es, mögliche Effekte dieser Substanz zu beobachten.

Clofibrinsäure wurde unter anderem von FERRARI ET AL. (2004), METCALFE ET AL. (2003), CALAMARI ET AL. (2003) und TERNES (1998) in der aquatischen Umwelt nachgewiesen. Mittlerweile ist die Verschreibung von Clofibrinsäurederivaten stark rückläufig (SCHWABE & PAFFRATH 2004). TIXIER ET AL. (2003) fanden in Kläranlagenabläufen noch bis zu 60 ng/l, in Oberflächengewässern bis zu 30 ng/l. Grund hierfür ist, dass Clofibrinsäure auch ein Abbauprodukt anderer Lipidsenker ist. Da die Substanz in aquatischen Systemen hochgradig persistent ist (LÖFFLER ET AL. 2005), ist sie ebenso wie Carbamazepin ubiquitär in der Umwelt nachweisbar, sogar in der Nordsee (BUSER & MÜLLER 1998). Da außerdem vereinzelte Nachweise von Clofibrinsäure im Grund- und Trinkwasser erfolgten (HEBERER & STAN 1997, HEBERER ET AL. 2002, STAN ET AL. 1994) und es somit eine Verbreitung dieses Pharmakons durch alle Umweltkompartimente hindurch gibt, ist es erforderlich, Kenntnisse über mögliche Umwelteffekte auch bei sinkenden Verschreibungsmengen zu gewinnen.

Ciprofloxacin ist bislang nur in wenigen Fällen in Oberflächengewässern abseits von Kläranlagenabläufen nachgewiesen worden. KOLPIN ET AL. (2002) fanden Ciprofloxacin in US-amerikanischen Oberflächengewässern, der Medianwert lag bei 0,02 µg/l, maximal wurden 0,03 µg/l nachgewiesen. CALAMARI ET AL. (2003) fanden bei Messungen in den italienischen Flüssen Po und Lambro Konzentrationen von 0,026 µg/l und 0,014 µg/l. Die in Kläranlagenabläufen gemessenen Konzentrationen lagen deutlich höher. GOLET ET AL. (2001) wiesen in den Primärabläufen von Schweizer Kläranlagen bis zu 0,4 µg/l, in den Tertiärabläufen noch bis zu 0,1 µg/l nach. HARTMANN ET AL. (1999) fanden bis zu 124 µg/l in den Abwässern verschiedener Kliniken. Bei diesen Konzentrationen traten bereits erste DNA-Schäden und Mutationen bei Bakterien auf. Obwohl Ciprofloxacin nicht so häufig in der Umwelt nachzuweisen ist wie die beiden vorhergehenden Substanzen, ist aufgrund seines gentoxischen Potentials eine Untersuchung möglicher Effekte geboten.

Für die in dieser Studie untersuchten Testorganismen können Veränderungen in der Bakterienflora von Bedeutung sein, da sich besonders Chironomiden von den im Sediment befindlichen Bakterien ernähren (ARMITAGE ET AL. 2005). Hier auftretende Veränderungen können somit zu verschlechterten Nahrungsbedingungen für Chironomidenlarven führen. Effekte auf

sedimentbewohnende Lebewesen sind denkbar, da Fluorochinolone stark sedimentbindend sind (KÜMMERER 2003, GOLET ET AL. 2003).

Daneben sind andere, unspezifische Effekte des Ciprofloxacins möglich. Ciprofloxacin wirkt als Hemmer der bakteriellen Gyrase, letztlich ist die Wirkung genetisch vermittelt. RIESBECK ET AL. (1994) zeigen weitere, nicht-antibakterielle Wirkungen von Ciprofloxacin. Es ist somit denkbar, dass zusätzliche, unspezifische Wirkungen dieses Antibiotikums auftreten können, die durch Effekte in der Gen-Enzym-Wirkkette entstehen. Bei den Effekten von Carbamazepin auf *C. riparius*, die in dieser Studie beobachtet wurden, lag ein ähnlicher Effekt vor. Bis zum vierten Larvenstadium erfolgte eine äußerlich normale Entwicklung, anschließend wurde die Entwicklung von der Larve zur Puppe blockiert. Es lag ein offensichtlich sehr spezifischer Effekt vor, der nur einen bestimmten, essentiellen Entwicklungsschritt betraf. Solche Effekte können auch für andere Pharmaka nicht ausgeschlossen werden, vor allem, wenn genetisch vermittelte Nebeneffekte bereits bekannt sind. So fanden FORSGREN ET AL. (1987) In-vitro-Effekte von Ciprofloxacin auf das Zellwachstum eukaryotischer Zellen. Vor dem Hintergrund solcher Befunde ist es dringend erforderlich, potenzielle Umwelteffekte von Ciprofloxacin zu untersuchen. Wenn diese Substanz auch in den Kläranlagen zu großen Teilen durch Sorption an den Klärschlamm gebunden wird (GOLET ET AL. 2003), können auch die noch in die Umwelt gelangenden Anteile für Sedimentorganismen bedenklich werden. Die Anreicherung von Ciprofloxacin in den Sedimenten von Gewässern wirkt nicht eliminierend, sondern vielmehr als Belastung des Lebensraums zahlreicher Arten. Eine Akkumulation solcher Pharmaka ist möglich, so dass Effekte in der Zukunft denkbar sind. Zudem gelangen zum Beispiel in der Fischzucht eingesetzte Chinolone direkt in die Umwelt, ohne Kläranlagen zu passieren. Effekte dieser Substanzklasse sind somit zu untersuchen.

Fluoxetin wurde ausgewählt, da es nach den für Carbamazepin nachgewiesenen Effekten interessant erschien, neben Antiepileptika eine weitere Gruppe von psychoaktiven Pharmaka zu untersuchen, zumal Carbamazepin ein Derivat trizyklischer Antidepressiva ist. Wenn auch bis jetzt nur vereinzelt Angaben über zu erwartende beziehungsweise gemessene Umweltkonzentrationen von Fluoxetin vorliegen (KOLPIN ET AL. 2002 wiesen 0,012 µg/l in US-amerikanischen Oberflächengewässern nach), ist mit zunehmender Verordnung der Substanz auch mit einem Ansteigen der Umweltkonzentrationen zu rechnen. Für Fluoxetin liegen bereits Angaben über Effekte auf aquatische Invertebraten vor (BROOKS ET AL. 2003A, FONG 1998), die auf ein hohes Schadpotential schließen lassen. Die hohe Verweildauer im menschlichen Körper (drei Tage, BRUCHHAUSEN ET AL. 1993) deutet auf mögliche Bioakkumulation in aquatischen Organismen hin. BROOKS ET AL. (PERSÖNLICHE MITTEILUNG) fanden 1 ng/g bis 16 ng/g Fluoxetin und Norfluoxetin (Metabolit) im Gewebe von im Freiland gefangenen Fischen. In Leber und Hirn lagen sogar noch höhere Werte vor. Es ist bislang unklar, ob solche Befunde eine unmittelbare Gefahr andeuten, Tatsache ist jedoch, dass die Substanz hier in unerwünschter Weise vorkommt. Da Fluoxetin Muskel- und neuronale Rezeptoren blockieren kann (GARCIA-COLUNGA ET AL. 1997) sind negative Effekte zum Beispiel bei Fluchtreflexen zumindestens denkbar. In einem Test mit *Oryzias latipes* wiesen FORAN ET AL. (2004) erhöhte Östrogenwerte in weiblichen Fischen nach und IWAMATSU ET AL. (1993) beobachteten verfrühte Reifung der Oocyten. In einem Zehn-Tage-Versuch mit *Chironomus tentans* ermittelten BROOKS ET AL. (2003B) eine LC<sub>50</sub> von 15,2 mg/kg Sediment. Auch das Wachstum der Mücken war reduziert. Somit ist es dringend erforderlich, weitere Erkenntnisse über die ökotoxikologische Wirkung von Fluoxetin zu gewinnen. Parallel zur Bestimmung der Effekte auf aquatische Organismen ist es außerdem erforderlich, das Umweltverhalten dieses Medikaments möglichst genau zu studieren.



### 4.1.2 Wichtigkeit im Gesamtarzneimittelverbrauch

Antiepileptika machen nur einen geringen Anteil am gesamten Arzneimittelverbrauch aus. Laut SCHWABE & PAFFRATH (2004) lagen Antiepileptika im Jahr 2003 mit insgesamt 5,7 Millionen Verordnungen auf Rang 30 der verordnungstärksten Indikationsgruppen. Führend in dieser Liste sind mit weitem Abstand die Analgetika/Antirheumatika mit 93,0 Millionen Verordnungen sowie auf Rang 3 die Antibiotika und Antiinfektiva mit 41,8 Millionen Verordnungen. Betrachtet man jedoch die in den Gewässern gemessenen Konzentrationen, so zeigen sich stark unterschiedliche Werte. TERNES (1998) ermittelte aus Messungen in insgesamt 36 Gewässern einen Carbamazepingehalt von 0,82 µg/l (90-Perzentil-Wert). Für Acetylsalicylsäure, die wesentlich öfter verordnet wird (über 600 Millionen Tagesdosen im Vergleich zu 76 Millionen Tagesdosen für Carbamazepin), wird nur ein 90-Perzentil-Wert von 0,16 µg/l ermittelt, selbst der Maximalwert reicht mit 0,34 µg/l nicht an die Carbamazepinkonzentrationen heran. Dieselbe Veröffentlichung zeigt für eine Kläranlage bei Frankfurt am Main im Zulauf Acetylsalicylsäure-Tagesfrachten von etwa 180 g, im Ablauf jedoch nur etwa 30 Gramm. Für Carbamazepin liegen diese Werte bei 120 und 110 g. Es zeigt sich also, dass Carbamazepin fast vollständig in die aquatische Umwelt gelangt, wohingegen Acetylsalicylsäure weitgehend eliminiert wird. Diese geringe Resistenz gegenüber biologischem Abbau dürfte zu einer weiteren Reduzierung der in den Oberflächengewässern messbaren Konzentrationen führen.

Die Lipidsenker nehmen in der Liste der verordnungstärksten Indikationsgruppen im Jahr 2003 den 15. Platz ein (12,8 Millionen Tagesdosen), deutlich höher also als Carbamazepin. Bei genauerer Betrachtung zeigt sich für die Clofibrinsäurederivate und -analoge jedoch mit 127 Millionen Tagesdosen im Vergleich zu den 76 Millionen Tagesdosen für Carbamazepin, dass nicht ganz doppelt soviel Clofibrinsäure verschrieben wird. Die Tagesfracht an Clofibrinsäure ist so auch in der von TERNES (1998) beprobten Kläranlage deutlich geringer, es sind ca. 70 g. Jedoch wird mit 35 g praktisch genau soviel Clofibrinsäure in die aquatische Umwelt entlassen wie Acetylsalicylsäure, die ja in ungleich höheren Mengen eingetragen wird.

Da Clofibrinsäure als künstlicher Ligand am Steroid-Thyroid-Hormonrezeptor PPARα wirken kann (FORMAN ET AL. 1997), ist eine Beobachtung dieser Substanz trotz des mit 0,21 µg/l gegenüber Carbamazepin geringeren Vorkommens angezeigt. Zum Vergleich sei angemerkt, dass Ethinylöstradiol schon in Konzentrationen von 1 ng/l Effekte zeigt (ROUTLEDGE ET AL. 1998). Mögliche Einflüsse auf das Schilddrüsenhormonsystem sind von ökotoxikologischer Bedeutung, da hierüber unter anderem wesentliche Entwicklungsprozesse bei Vertebraten gesteuert werden (GALTON 1992, YAOITA & BROWN 1990). Derartige Effekte rücken in jüngster Zeit zunehmend in den Fokus ökotoxikologischer Forschung (BRUCKER-DAVIS 1998, OPITZ ET AL. 2005). Wenn diese Effekte auch nur Vertebraten betreffen, so sind Untersuchungen über mögliche Effekte auf Invertebraten trotzdem geboten. Abgesehen von möglichen Schadeffekten durch Verzehr kontaminierter Futtertiere gebietet allein die Rolle von *Chironomus* und *Lumbriculus* in der Nahrungskette, mögliche Effekte auf deren Populationen zu untersuchen, da Gefährdungen der Populationen solcher Invertebraten Beeinträchtigungen für das ganze Ökosystem nach sich ziehen können.

Vorkommen von Antibiotika in der Umwelt werden seit Jahrzehnten untersucht, seitdem bislang kontrollierbare bakterielle Erkrankungen nicht mehr therapiert werden konnten, da die entsprechenden Keime multiple Antibiotikaresistenzen entwickelt hatten (u. a. CHU ET AL. 1998). Die unverändert hohe Verordnungsrate von Antibiotika insgesamt lässt solche Untersuchungen dringend angeraten erscheinen. Im Jahr 2003 bildeten Antibiotika und Antiinfek-

tiva mit 41,8 Millionen Verordnungen die am dritthäufigsten verordnete Medikamentengruppe. Laut SCHWABE & PAFFRATH (2004) nimmt der Verbrauch von Fluorochinolonantibiotika außerdem zu. So sind die Gyrasehemmer in Deutschland die mittlerweile am vierthäufigsten verordnete Antibiotikagruppe. Die Verordnungsmengen von Fluorochinolonen sind in 2003 um 7,5 % angestiegen; diese Antibiotika sind aufgrund günstiger Pharmakokinetiken und verschiedenen breiten Wirkungsspektren zu den therapeutisch wichtigsten Vertretern dieser Antibiotikagruppe geworden. Sie werden bevorzugt bei Harnwegsinfektionen eingesetzt, wobei Ciprofloxacin speziell als auch systemisch anwendbares Fluorochinolon eine entsprechend größere Bedeutung hat. Da es seit einiger Zeit als Generikum erhältlich ist, ist eine Verordnungszunahme von insgesamt 20 % zu beobachten; einige Generikapräparate sind 2003 fast achtmal häufiger verschrieben worden als im Vorjahr. Somit ist ein weiterer Anstieg der in die Umwelt eingetragenen Mengen und dadurch auch des nach Kläranlagenpassage in der aquatischen Umwelt vorliegenden Fluoxetins zu erwarten. Abnehmende Verordnungsmengen sind nicht zu erwarten, da trotz eines Anstiegs der Resistenzen sowohl bei grampositiven als auch bei gramnegativen Keimen das Resistenzprofil der Gyrasehemmer immer noch verhältnismäßig günstig ausfällt (alle Angaben nach SCHWABE & PAFFRATH 2004). So wurde 2004 für Ciprofloxacin auf Intensivstationen eine Resistenzrate von 18,7 % angegeben. Im Vergleich hierzu ist für Amoxicilin/Clavulansäure eine Resistenzrate von 39,5 % festzustellen (GASTMEIER ET AL. 2004). Da Ciprofloxacin somit noch ein sehr günstiges Wirkprofil hat, ist mit weiterhin hohen Verordnungsmengen zu rechnen. Eine Beobachtung dieser Substanz im ökotoxikologischen Kontext ist somit unbedingt angeraten.

Psychopharmaka bilden derzeit (Stand: 2003) mit 38,3 Millionen Verordnungen die fünftgrößte Verordnungsgruppe (SCHWABE & PAFFRATH 2004). Gegenüber dem Vorjahr ist die Verordnungsrate um 4,2 % gestiegen und hat sich im Gesamtkontext vom sechsten auf den fünften Rang erhöht. Hauptsächlich resultiert dies aus dem Verbrauch an Antidepressiva, der sich in den vergangenen zehn Jahren mehr als verdoppelt hat. Speziell Fluoxetin ist aufgrund seiner stimmungsaufhellenden Wirkung und der zunächst für sehr gut befundenen Verträglichkeit besonders in den USA sehr oft verschrieben worden. OLFSON ET AL. (1998) berichten von einer Stilisierung Fluoxetins als „Lifestyle-Präparat“. Laut MEDAWAR (1994) resultiert dies aus sehr unkritischer und seduktiver Berichterstattung über Fluoxetin. Das Wirkprofil von Fluoxetin rechtfertigt diese Verordnungspraxis nicht (BARONDES 1994). Auch in Deutschland sind die Verordnungsraten nach Ende des Patentschutzes und der Verfügbarkeit preiswerter Generika stark gestiegen (SCHWABE & PAFFRATH 2004). Wenn auch mittlerweile Präparate mit günstigerem Wirkprofil im Gebrauch sind, so ist doch zumindest in naher Zukunft mit unverändert hohen Verordnungsmengen zu rechnen. Vor allem der Verbrauch an Generikapräparaten nahm in 2003 um bis zu 115% zu (SCHWABE & PAFFRATH 2004). Auch von der Verordnungsmenge her ist eine ökotoxikologische Beobachtung von Fluoxetin geboten.

### 4.1.3 Therapeutische Relevanz

#### a) Carbamazepin

Wichtigstes Verfahren zur Behandlung von Epileptikern ist die medikamentöse Therapie (SCHWABE & PAFFRATH 2004). Carbamazepin ist hierin bei der Behandlung sowohl generalisierter als auch partieller Epilepsie das Mittel der Wahl (FEELY 1999). Es wird bei Kindern und jungen Erwachsenen eingesetzt und kommt lediglich bei schwangeren Frauen (Fruchtschädigung) und älteren Patienten nicht in Frage. Trotz gelegentlicher systemischer Reaktionen (Ausschlag) ist es grundsätzlich zunächst das Mittel der Wahl in allen beschriebenen

Gruppen, zumal eventuellen Nebenwirkungen durch Benutzen einer Formulierung mit verzögerter Wirkstofffreisetzung entgegengewirkt werden kann. Vorteil ist, dass Carbamazepin nicht sedierend wirkt.

Zur Epilepsiebehandlung ist Carbamazepin der fraglos wichtigste Wirkstoff. Das Verordnungsniveau ist seit 1996 annähernd konstant (SCHWABE & PAFFRATH 2004). Der Wirkstoff wird als Monotherapie eingesetzt. Ein Wirkstoff mit vergleichbarem Wirkpotential steht nicht zur Verfügung, das Alternativpräparat Valproinsäure hat deutlich stärkere Nebenwirkungen und kann nur bei älteren Patienten dauerhaft eingesetzt werden (FEELY 1999). Neu zugelassene Antiepileptika sind bislang weitgehend nicht als Monotherapeutika zu gebrauchen. Es ist also davon auszugehen, dass in absehbarer Zeit kein Ersatzstoff für Carbamazepin zur Nutzung gelangen wird. Die hohe therapeutische Relevanz in der Epilepsitherapie wird somit erhalten bleiben.

Zusätzlich kommt Carbamazepin in der Behandlung von akutem Alkoholentzug (STERNEBRING ET AL. 1992, CHU 1979), bei Trigeminusneuralgien (MÖBIUS ET AL. 1984) und der Behandlung von Depressionen zum Einsatz (MONTGOMERY ET AL. 2000). Das breite Einsatzspektrum erhöht die therapeutische Relevanz des Wirkstoffs und vergrößert die Eintragsmenge in die Umwelt.

##### b) Clofibrinsäure

Die therapeutische Relevanz der Clofibrinsäurepräparate und -analoge ist seit längerer Zeit rückläufig (SCHWABE & PAFFRATH 2004). Seit neun Jahren dominieren im Bereich der lipidsenkenden Medikamente die Statine den Markt. Nicht zuletzt ist dies auf eine bessere Reduktion der LDL-Cholesterinwerte durch die Statine zurückzuführen. Clofibrate senken bevorzugt erhöhte Triglyceridspiegel, die cholesterinsenkende Wirkung ist weniger stark ausgeprägt. Bezafibrat und Fenofibrat sind deutlich wirksamer, bleiben aber noch hinter den Statinen zurück. Die Wirksamkeit in Bezug auf kardiale Endpunkte (Herzinfarkt, Sekundenherztod) konnte nicht belegt werden. Die beste Wirkung innerhalb der Fibrate hat Gemfibrozil, dessen klinische Wirksamkeit belegt werden konnte (22 % Ereignisreduktion, RUBINS ET AL. 1999).

Somit ist nach dem gegenwärtigen Stand der Forschung von einem zunehmenden Rückgang des Neueintrags von Clofibrinsäure in die aquatische Umwelt auszugehen. Diese Zahlen lassen eine Beobachtung der Substanz auf den ersten Blick als unnötig erscheinen. Wie bereits dargelegt, ist die Substanz jedoch unverändert in der Umwelt vorhanden und auch quer durch alle Umweltkompartimente mobil.

##### c) Ciprofloxacin

Die Anwendung der Fluorochinolonantibiotika steigt laut SCHWABE & PAFFRATH (2004) seit geraumer Zeit an. Ciprofloxacin befindet sich in einer von der Paul-Ehrlich-Gesellschaft erstellten Klassifikation in der zweiten Gruppe. Die erste Gruppe umfasst die sogenannten Harnwegs-Fluorochinolone, die in ihrer Anwendbarkeit stark begrenzt sind. Ihre Verordnungsmengen sind seit einiger Zeit rückläufig. Ciprofloxacin gehört in die zweite Gruppe der Fluorochinolone, die sich durch große systemische Wirksamkeit auszeichnet. Die Präparate sind gegenüber grampositiven Bakterien nicht so aktiv wie die speziell dadurch gekennzeichnete dritte Gruppe, jedoch von guter Wirksamkeit gegen gramnegative Bakterien, unter anderem *Pseudomonas aeruginosa* (Erreger u. a. von Lungenentzündung und Atemwegsinfektionen).

fekten). Die Fluorochinolone der zweiten Gruppe gelten mittlerweile als die Standardfluorochinolone. Speziell für Ciprofloxacin sind bei den mittlerweile häufigen Generika hohe Steigerungen der Verbrauchsdaten zu verzeichnen, sie machen den größten Anteil der bei den Fluorochinolonen beobachtbaren Zuwachsraten aus. Seit 2003 bilden die Gyrasehemmer die viertstärkste Verordnungsgruppe der Antibiotika überhaupt, hierin sind die Fluorochinolone die größte Gruppe. Mit steigendem Eintrag von Ciprofloxacin in die Umwelt ist daher zu rechnen.

#### d) Fluoxetin

Grundsätzlich ist seit zehn Jahren eine Veränderung in der Verordnungsstruktur der Psychopharmaka zu beobachten. Vor allem der Gebrauch von Tranquillantien ist rückläufig: Im Jahr 1994 wurden noch 229 Millionen Tagesdosen dieser Substanzen verschrieben, 2003 waren es mit 165 Millionen über ein Viertel weniger. Parallel dazu sind die Verordnungen von Antidepressiva von 264 Millionen auf 605 Millionen Tagesdosen angestiegen, sie haben sich also mehr als verdreifacht. Ursache hierfür ist vor allem eine verbesserte Diagnose der Depression, sowie eine Ausweitung des Indikationsspektrums „Depression“. Hinzu kommt eine zunehmende Kritik an der Verordnungsweise von Tranquillantien (hauptsächlich Benzodiazepine). Diese sind laut Expertenmeinung über zu lange Zeiträume und häufig ohne korrekte Indikation verschrieben worden, da sie häufig zur Behandlung ängstlich-depressiver Symptome genutzt wurden (SCHWABE & PAFFRATH 2004). Vor diesem Hintergrund ist eine weitere Zunahme der Verordnungen von Antidepressiva insgesamt zu erwarten.

Selektive Serotonin-Rückaufnahme-Hemmer werden im Vergleich zu den übrigen Substanzgruppen der Antidepressiva zunehmend häufiger verordnet. Im Gegensatz zu den trizyklischen Antidepressiva wirken sie nicht sedierend und haben keine vegetativen Nebenwirkungen, es steht die stimmungsaufhellende Wirkung im Vordergrund.

Fluoxetin ist zwar aufgrund zahlreicher Interaktionen mit anderen Medikamenten sowie diverser Nebenwirkungen nicht mehr der bevorzugte Vertreter dieser Gruppe. Dennoch wurden in 2003 deutlich mehr fluoxetinhaltige Arzneimittel verordnet, da mittlerweile zahlreiche Generikapräparate zur Verfügung stehen (SCHWABE & PAFFRATH 2004).

Die therapeutische Relevanz von Fluoxetin gebietet somit, diese Substanz auf potentielle Umwelteffekte zu testen.

### 4.1.4 Auswahl der Konzentrationsbereiche

Zur Ermittlung der Konzentrationsbereiche, innerhalb derer in den Sedimenttoxizitätstests gearbeitet wurde, dienten die gemessenen beziehungsweise berechneten Umweltkonzentrationen der Testsubstanzen. Für Carbamazepin, Clofibrinsäure, Ciprofloxacin und Fluoxetin lagen im Oberflächenwasser gemessene Umweltkonzentrationen vor.

Die Konzentrationsbereiche der Akuttests wurden sehr weitreichend gewählt, die Konzentrationen wurden jeweils um den Faktor 20 erhöht. Auf diese Weise konnte sowohl ein Wert im Rahmen der Umweltkonzentration berücksichtigt werden, als auch deutlich höhere Bereiche, in denen akut toxische Wirkung möglich war.

Die Konzentrationen in aquatischen Tests folgten direkt den bekannten Mess- bzw. Schätzwerten im Wasser. Sie sind somit für die Interpretation der Testergebnisse tragfähig.

Die Konzentrationen des Sedimenttests mit Carbamazepin und *C. riparius* in Serie I wurden zunächst willkürlich festgesetzt. Anhand der dort festgestellten Effekte wurde der Konzentrationsbereich für die Serien II – IV festgelegt, um die Effektkonzentrationen genauer einzugrenzen.

Die Konzentrationen in den Sedimenttests für Clofibrinsäure wurden zuerst bewusst hoch angesetzt, um festzustellen, ob eine toxische Wirkung erkennbar war. Da dies nicht der Fall war, wurde auf Tests mit geringeren Substanzmengen verzichtet.

Ciprofloxacin wurde aufgrund von persönlicher Mitteilung von ALEXY (2003) in den eingesetzten Konzentrationen verwendet, die Mitteilung gab niedrigere Werte als die in Tabelle 4.2 errechnete  $PEC_{sed}$  an. Zudem kann anhand der bisher vorliegenden Messdaten noch nicht von flächendeckender Belastung von Sedimenten mit Carbamazepin in der errechneten Höhe ausgegangen werden.

Für Fluoxetin lag als Richtwert nur die von BROOKS ET AL (2003A) für *C. tentans* ermittelte  $LC_{50}$  von 15,2 mg/kg vor. Der in dieser Arbeit überprüfte Konzentrationsbereich wurde gewählt, um zu prüfen, ob bereits i subletalen Bereich populationsrelevante Effekte auftreten.

## 4.2 Carbamazepin

### 4.2.1 Emergenz *C. riparius*

Erste signifikante Effekte treten bei einer Carbamazepinkonzentration von 1,25 mg/kg TG auf (Serie III, signifikante Reduzierung der Emergenz). Dieser Wert kann somit als LOEC gelten. Bei der Analyse von Sediment und Überstandswasser fanden sich im Sediment 0,234 mg/kg Carbamazepin, im Wasser 0,332 mg/l. Zwar liegt der LOEC in Serie II höher, doch ging hier eine längere Alterungsphase voraus, hier dürfte mehr Carbamazepin in die Wasserphase übergegangen sein (LÖFFLER ET AL. 2005). Da Chironomidenlarven Sedimentbewohner sind (ARMITAGE ET AL. 1995), ist für die Festlegung aller Effektdaten (LOEC, NOEC,  $EC_{10}$ ,  $EC_{50}$ ) die gemessene Sedimentkonzentration heranzuziehen; der Vergleich von Serie III zu Serie II zeigt, dass dieser Wert der relevante ist.

In der Versuchsserie IV ist bei der Nominalkonzentration 1,25 mg/kg zwar ein deutlicher, aber noch kein signifikanter Rückgang festzustellen. Hier wirkt sich offensichtlich die erhöhte Temperatur aus, die laut HAUER & BENKE (1991) zu erhöhter Emergenz bei Chironomiden führt. Dies darf jedoch nicht zur Annahme verleiten, höhere Temperaturen könnten die durch Carbamazepin verursachten Effekte ganz oder teilweise aufheben. Wie sich bei der Betrachtung der Gelegezahlen zeigt, sind die geschlüpften Weibchen kaum noch fertil. Das Überleben von bei erhöhter Temperatur erbrüteten Chironomidenpopulationen in der nächsten Generation ist also mehr als fraglich. Eine Fertilität der Gelege konnte nicht überprüft werden, da die Bechergläser, in die die geschlüpften Mücken umgesetzt wurden, keinen Schwarmflug zuließen, die Gelege, wie eine entsprechende Überprüfung ergab, unbefruchtet waren. Allein aufgrund der sehr stark erniedrigten Gelegezahl jedoch ist ein Überleben solcher Populationen in der nächsten Generation kaum möglich.

In Serie I treten erst ab einer Konzentration von 4 mg/kg TG signifikante Effekte auf. Die Analyse zeigt dort jedoch eine tatsächliche Sedimentkonzentration von 0,24 mg/kg, kaum mehr als für die nominale LOEC in Serie III. In dieser Versuchsserie musste teilweise ver-

schimmeldes Laub aus den Testgefäßen abgesaugt werden. Offensichtlich ist dabei auch Carbamazepin aus den Testgefäßen entfernt worden. Die Ergebnisse aus Versuchsserie I gehen daher mit den übrigen Daten konform. Die in Serie III festgestellte LOEC von 0,234 mg/kg kann somit als bestätigt gelten.

Ganz offensichtlich wirkt Carbamazepin gezielt auf die Verpuppung der Mücken: In Versuchsserie II konnten in den höchsten Behandlungsstufen mehrfach Mücken festgestellt werden, die offensichtlich am Ende des vierten Larvenstadiums standen. Statt sich jedoch zu verpuppen, wanden sich die Larven über mehrere Tage auf der Sedimentoberfläche und starben schließlich. Andere konnten sich zwar noch verpuppen, die Imagines kamen jedoch nicht zum Schlupf. Angesichts dieser Effekte ist von einer Einwirkung des Carbamazepins auf hormonell gesteuerte Effekte auszugehen. Aus Beim menschlichen Organismus wurden derartige Effekte verschiedentlich beobachtet. KIMURA ET AL. (1974) berichten über durch Carbamazepin induzierte Diurese durch Freisetzung von antidiuretischem Hormon. JOFFE ET AL. (1984) stellten eine blockierende Wirkung von Carbamazepin auf die Wirkung von Thyroid-freisetzendem Hormon fest, BAUMGARTNER ET AL. (1997) wiesen hingegen eine stimulierende Wirkung von Carbamazepin auf die Aktivität der 5'-Deionidase II von Ratten nach, die die Umwandlung von  $T_4$  in  $T_3$ , die aktive Form des Thyroxins, steuert. CONNELL ET AL. (1984) wiesen reduzierte Androgengehalte und erhöhte Konzentrationen von Sexualhormonbindendem Globulin im Blut von Epileptikern nach. In ähnlicher Weise berichten ISOJARVI ET AL. (1995) über reduzierte 17- $\beta$ -Östradiolgehalte und gesteigerte Konzentrationen von Sexualhormonbindendem Globulin im Blut von mit Carbamazepin behandelten Epileptikerinnen. Eingriffe von Carbamazepin in hormonell gesteuerte Prozesse sind somit prinzipiell möglich. Ob dies allerdings hier der Fall ist und was genau betroffen ist, die Aktivierung bestimmter Hormonrezeptoren oder weiter unten in der Enzymkaskade gelegene Schritte, kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht beantwortet werden. Hierfür wären weitere Versuche, zum Beispiel eine Kombination von Carbamazepin mit einem Ecdyson-Agonisten, erforderlich. Effekte auf dieses Hormonsystem würden auch andere Insekten betreffen, da das Häutungshormon Ecdyson in vielen Insektenordnungen verbreitet ist.

Ein Effekt auf den zeitlichen Verlauf der Emergenz ist nicht festzustellen. Die  $EmT_{50}$  sind in keiner der Serien signifikant von der Lösemittelkontrolle verschieden. Dieser Parameter ist somit unbeeinflusst.

#### 4.2.2 Mortalität *C. riparius*

Carbamazepin führt gewissermaßen indirekt zu einer erhöhten Mortalität bei *C. riparius*. Wie sich an den dramatisch sinkenden Emergenzraten zeigt, überleben letztlich wenige Larven eine Carbamazepinbelastung von über 0,234 mg/kg bis zum Schlupf der Imagines, so dass im Endeffekt eine erhöhte Mortalität festgestellt werden kann. Dies geht jedoch nicht auf eine direkte Toxizität zurück, sondern auf die Hemmung der Verpuppung. Bis zum vierten Larvenstadium tritt keine erhöhte Mortalität auf, die Larven entwickeln sich offensichtlich ungestört. Da jedoch die weiteren Schritte bis zum Schlupf der Imagines, Verpuppung und Metabolie, blockiert sind, sterben die Larven schließlich ab. Eine direkte toxische Wirkung von Carbamazepin kann nicht festgestellt werden. Nichtsdestoweniger führt eine Carbamazepinbelastung in den durchgeführten Versuchen zum Aussterben der Versuchspopulationen.

Die Mortalität in den Kontrollen liegt im Rahmen der von der OECD-Richtlinie 218 (OECD 2004) vorgegebenen Validitätskriterien. Eine Mortalität von 70 % wird in keiner der Kontrollen überschritten. Auch erfolgte die Emergenz in den Kontrollen zwischen Tag 12 und 23,

wie vorgeschrieben. In den durchgeführten Versuchen begann die Emergenz nie später als am Tag 15, sie war bis zum Tag 23 fast durchweg abgeschlossen. In Serie II traten noch am Tag 26 vereinzelte Schlupfereignisse auf. Die Resultate folgen jedoch den in den anderen Versuchen gefundenen Resultaten, vereinzelte Verschiebungen um einige Tage beeinträchtigen das Gesamtergebnis an sich nicht. In Versuchsserie IV erfolgte der Schlupf früher als in der OECD-Richtlinie vorgesehen, hier begann die Emergenz an Tag 11 und war binnen zwei Tagen im Wesentlichen abgeschlossen; es folgten nur noch Einzelereignisse. Da dieser Test jedoch gezielt die Effekte einer erhöhten Temperatur untersuchen sollte, wurde hier bewusst von der OECD- Richtlinie 218 abgewichen, die für *C. riparius* eine Expositionstemperatur von 20°C vorsieht. Die verfrühte Emergenz entspricht den Angaben von HAUER & BENKE (1991).

Im übrigen bestätigen sich die bisher getroffenen Aussagen auch für Versuchsserie IV. Die Emergenz ist ab einer Nominalkonzentration von 1,25 mg Carbamazepin/kg Sediment sichtbar reduziert, ab einer Nominalkonzentration von 2,5 mg/kg schlüpfen kaum noch Mücken, in den folgenden Behandlungsstufen keine mehr.

#### 4.2.3 Gelegezahl und Zahl der Eier pro Gelege bei *C. riparius*

Es ergeben sich in denjenigen Behandlungsstufen, in denen durch das Carbamazepin noch keine Emergenzrückgänge eingetreten sind, keine Änderungen in der Gelegezahl gegenüber den Kontrollen. Lediglich in der Lösemittelkontrolle der dritten Versuchsserie sind in der Lösemittelkontrolle signifikant weniger Gelege pro Weibchen vorhanden als in den übrigen Versuchsansätzen. Hier liegt wahrscheinlich ein Versuchsartefakt vor. Dies dürfte auch auf die geringere Gelegezahl in der Serie I, Behandlungsstufe 0,8 mg/kg zutreffen. Der Rückgang der Gelegezahl in den höher belasteten Ansätzen fällt mit der allgemein rückläufigen Emergenz und somit auch mit dem Rückgang an weiblichen Mücken zusammen. Es ist jedoch kein direkter Effekt des Carbamazepins auf die Gelegezahl zu sehen.

Die Wirkung des Antiepileptikums Carbamazepin auf *C. riparius* ist somit eindeutig auf eine Störung des Übergangs vom vierten Larvenstadium zur Puppe beschränkt. Weitere Effekte, wie etwa eine Veränderung des Geschlechterverhältnisses, eine Senkung der Gelegezahl pro Weibchen oder eine Reduzierung der Eizahl pro Gelege liegen nicht vor. Einzig möglicher Effekt, der im Rahmen dieser Arbeit nicht erschöpfend behandelt werden konnte, wäre eine mögliche Beeinträchtigung der Fertilität von Mücken, die Carbamazepinkonzentrationen unterhalb der hier definierten LOEC ausgesetzt waren.

In diesen Versuchen waren die Gelege aller Behandlungsstufen nicht befruchtet, somit konnte kein Versuch über mehrere Generationen durchgeführt werden. Weitere Versuche zur Untersuchung der Toxizität von Carbamazepin auf *C. riparius* sollten daher unbedingt so angelegt sein, dass die Fertilität der Gelege über mehrere Generationen verfolgt werden kann. Um eine endgültige Bewertung der Toxizität von Carbamazepin vornehmen zu können, sind solche Daten erforderlich.

#### 4.2.4 Vermehrung *L. variegatus*

Die Vermehrung von *L. variegatus* wurde durch Carbamazepin nicht beeinträchtigt. Wie die Ergebnisse zeigen, sind sowohl die Anzahl der Würmer als auch die Biomasse zufällig verteilt. Das in der Gesamtübersicht entstehende Bild einer umgekehrten U-Kurve kann bei Betrachtung der Würmer getrennt nach erwachsenen und neugebildeten Tieren nicht bestätigt werden. Betrachtet man die erwachsenen Würmer, so zeigt sich, dass deren Zahl in fast

allen Ansätzen gleich geblieben ist. Die geringfügige Mehrzahl in der Behandlungsstufe 2,5 mg/kg TG ist nicht signifikant, der Unterschied beträgt durchschnittlich einen Wurm. Hier hält sich also die Zahl der im Versuch verstorbenen und neu herangewachsenen Würmer die Waage. Bei Betrachtung der kleinen Würmer zeigt sich, dass die Unterschiede in den Gesamtzahlen wesentlich auf deren Anzahl zurückgeht. Nirgends jedoch liegt ein signifikanter Unterschied vor. Die Behandlungsstufe 2,5 mg/kg TG weist zwar die meisten Würmer auf, doch folgen die anderen belasteten Ansätze dem U-Kurven-Trend nicht. Die Behandlungsstufe 0,625 mg/kg zeigt mehr, die Behandlungsstufe 5 mg/kg weniger Würmer als die jeweils folgende, was dem Eindruck, der bei Betrachtung der Gesamtzahlen zunächst entsteht, klar widerspricht. Hier wäre jedoch, falls ein Effekt auf die Reproduktion von *L. variegatus* eingetreten wäre, vor allem mit sichtbaren und signifikant von der Kontrolle verschiedenen Effekten zu rechnen gewesen, da die neu entstandenen Würmer das Reproduktionsvermögen des jeweiligen Versuchsansatzes zeigen. Die vorliegenden Wurmzahlen sind jedoch zufällig verteilt. Somit ist nicht von einem fördernden oder hemmenden Effekt der Versuchssubstanz auf die Versuchsorganismen auszugehen.

Die Biomasse ist in allen Behandlungsstufen ähnlich. Bis auf die Ansätze 0,625 und 5 mg/kg TG zeigt sich in allen Ansätzen praktisch die gleiche Biomasse, die genannten Unterschiede weichen nicht signifikant ab. In der Behandlungsstufe 0,625 mg/kg TG, die die zweithöchste Wurmanzahl des gesamten Versuchs aufweist, steht offensichtlich weniger Nahrung pro Wurm zur Verfügung. In der Behandlungsstufe 5,0 mg/kg trifft dies nicht zu. Ein Effekt des Carbamazepins ist nicht anzunehmen, da die folgende Behandlungsstufe nicht betroffen ist. Möglich ist ein kompletter „turnover“ der eingesetzten Würmer, also eine komplette Teilung bei allen Würmern, gefolgt von einem Absterben der meisten neugebildeten Tiere. Die hier als „erwachsen“ eingestuft Tiere wären dann in Wahrheit eine bereits herangewachsene zweite Generation.

Eine erhöhte Mortalität konnte in keiner der Behandlungsstufe beobachtet werden. Denkbar wären sowohl direkt toxische Effekte gewesen, da Carbamazepin nekrolytisch wirken kann (FRIEDMANN ET AL. 1994), als auch Effekte auf Wachstum und Zellproliferation, da sich Carbamazepin im Laborversuch auch als Beschleuniger der Zellproliferation erwies (ZAKRZEWSKA & IWANI 1988).

Zusammenfassend bleibt jedoch festzustellen, dass auch die Biomasse keinem Trend folgt, der eine Wirkung des Carbamazepins erkennen ließe.

Anzumerken ist an dieser Stelle, dass die Reproduktionsfaktoren in allen Ansätzen sehr niedrig liegen. In einzelnen Replikaten kommen Vermehrungsfaktoren bis zu 2,5 vor, im Gesamtdurchschnitt nicht mehr als 1,9. Verglichen mit den Ergebnissen von OETKEN ET AL. (2001), die eine Reproduktionsrate von 3 erzielten, ist das ein niedriger Wert. Grund ist möglicherweise die Sedimentzusammensetzung, auch jahreszeitliche Schwankungen sind möglich. Außer im zweiten Versuchsdurchgang mit Ciprofloxacin (hier wurde ein Reproduktionsfaktor von 3 erreicht) konnten nie Reproduktionsraten über 2 erzielt werden. Ein Indiz für möglicherweise saisonal bedingte Schwankungen in der Reproduktionsleistung ist, dass dieser Ciprofloxacin-Versuch im Sommer stattfand, die anderen Versuche mehrheitlich in Herbst und Winter. Es ist denkbar, dass sich die Zuchttiere ihren jahreszeitlichen Vermehrungsrhythmus bewahrt haben.



#### 4.2.5 Embryonenzahl *P. antipodarum*

Die Embryonenzahl der untersuchten *P. antipodarum* bietet ein wechselhaftes Bild ohne klare Trends. Nachdem bei der ersten Auswertung zunächst deutliche Rückgänge der Embryonenzahlen in der Lösemittelkontrolle und den Behandlungsstufen 0,4 und 10 µg/l zu verzeichnen sind, während die übrigen Behandlungsstufen kaum Veränderungen aufweisen, zeigt sich in der folgenden Woche ein sichtlich verändertes Bild. In der Lösemittelkontrolle liegen nun mehr Embryonen als in der unbehandelten Kontrolle vor, auch die Embryonenzahlen in den Behandlungsstufen 0,4 und 10 µg/l sind gestiegen, so dass die Gesamtübersicht ein nivelliertes Bild zeigt (Abb. 3.24). Im Dunnett-Test werden die Gesamt-embryonenzahlen der Behandlungsstufen 2 und 10 µg/l als signifikant verschieden von der Lösemittelkontrolle eingestuft, trotz der geringen Unterschiede in den Embryonenzahlen. Die Unterschiede zeigen sich in dieser Form sowohl bei den Gesamt-embryonenzahlen, als auch bei den beschalteten Embryonen. Bei den unbeschalteten Embryonen hingegen ist in diesen Behandlungsstufen kein Unterschied sichtbar. Dafür haben die Tiere der Behandlungsstufe 0,4 µg/l schwach und die Tiere der unbehandelten Kontrolle hochsignifikant weniger Embryonen als die der Lösemittelkontrolle. Die Tiere der Behandlungsstufe 2 µg/l haben in etwa genauso viele Embryonen wie die Lösemittelkontrolle, die der Behandlungsstufe 10 µg/l kaum weniger. Die beobachteten Unterschiede erscheinen also bis hierher als zufällige Schwankungen. Besonders zu bemerken ist, dass die unbeschalteten Embryonen, die ja am deutlichsten einen Überblick über die Reproduktionsfähigkeit der Versuchstiere geben, nicht betroffen sind. In der Vorwoche liegt bei den unbeschalteten Embryonen der Behandlungsstufe 10 µg/l noch eine gegenüber der Lösemittelkontrolle signifikant niedrigere Zahl vor, doch ist dieser Unterschied zum Zeitpunkt  $t_{14}$  fast ausgeglichen. Ein dauerhafter Effekt der Versuchssubstanz ist also nicht zu sehen. Die reduzierte Embryonenzahl geht daher nicht auf einen Einfluss des Carbamazepins zurück. Ebenso liegen in der Behandlungsstufe 0,4 µg/l keine signifikanten Unterschiede vor, die Tiere der unbehandelten Kontrolle haben sogar geringfügig mehr Embryonen als die der Lösemittelkontrolle. Vor allem dieser Befund zeigt, dass in den Embryonenzahlen auch ohne Zugabe einer Versuchssubstanz Schwankungen auftreten, die zu signifikanten Unterschieden in den Embryonenzahlen führen können.

Im Folgenden tritt in allen behandelten Ansätzen ein Wachstumsschub auf, der zu einer Nivellierung in der Gesamtübersicht führt. Die Tiere in den behandelten Ansätzen weisen nunmehr fast gleich viele Embryonen auf, am höchsten ist die Zahl in der Behandlungsstufe 250 µg/l. Keine der Behandlungsstufen zeigt eine gegenüber der Lösemittelkontrolle signifikant erhöhte Embryonenzahl, bis auf die Behandlungsstufen 0,4 und 250 µg/l liegen die behandelten Ansätze mit der Lösemittelkontrolle fast gleichauf. Die beschalteten Embryonen folgen diesem Trend nicht, hier zeigt sich eine zunächst gegenüber der Lösemittelkontrolle absinkende Zahl in allen Ansätzen, erst in der Behandlungsstufe 250 µg/l liegt eine der Lösemittelkontrolle vergleichbare Zahl vor. Der eingetretene Wachstumsschub geht auf die unbeschalteten Embryonen zurück, hier bietet sich fast das gleiche Bild wie in der Gesamtübersicht. Die Behandlungsstufen 0,4 und 10 µg/l haben signifikant mehr unbeschaltete Embryonen verglichen mit der Lösemittelkontrolle. Der Unterschied beträgt im Durchschnitt nur wenig mehr als einen Embryo. Auch die übrigen Behandlungsstufen haben etwa einen Embryo mehr, hier werden jedoch keine signifikanten Unterschiede erkannt. In der darauffolgenden Woche ist das Bild wieder uneinheitlicher, zwar setzt sich der Anstieg der Embryonenzahlen fort, doch ist die Bildung neuer Embryonen teilweise wieder rückläufig. So nimmt etwa die Zahl der Embryonen in den Behandlungsstufen 50 und 250 µg/l merklich ab, auch in den anderen Behandlungsstufen ist - bis auf die Gruppe 0,4 µg/l - ein leichter Rückgang gegenüber der Vorwoche erkennbar. Erneut zeigen die Behandlungsstufen 0,4 und 10 µg/l

gegenüber der Lösemittelkontrolle signifikant erhöhte Embryonenzahlen, dies spiegelt sich in der Gesamtübersicht nur teilweise wider. Hier sind in den Behandlungsstufen 10 und 250 µg/l die Embryonenzahlen gegenüber der Lösemittelkontrolle signifikant erhöht. Letztere Behandlungsstufe fällt in den Einzelbetrachtungen nicht auf, lediglich die Gesamtsumme wird im Dunnett-Test als signifikant erkannt. Die Behandlungsstufe 0,4 µg/l zeigt hier keine signifikant verschiedenen Embryonenzahlen.

Alles in allem ergibt sich aus diesen Befunden kein schlüssiger Hinweis darauf, dass Carbamazepin zu einer Erhöhung der Embryonenzahlen bei *P. antipodarum* führen könnte. Denkbar wären erniedrigte Embryonenzahlen gewesen, da Carbamazepin beim Menschen zu erniedrigten Östrogenleveln führen kann (ISOJARVI ET AL. 1995). Die feststellbaren erhöhten Embryonenzahlen erscheinen somit nicht als Folge der Carbamazepinbelastung. Es handelt sich um Einzelbefunde, die keiner Konzentrations-Wirkungsbeziehung folgen. Bei einer Carbamazepinwirkung im Sinne sinkender Östrogenlevel wäre eine solche Beziehung zu erwarten gewesen, das heißt, die Embryonenzahlen hätten mit zunehmender Carbamazepin-Konzentration sinken müssen, oder es hätte sich eine umgekehrte U-Kurve ergeben können, also eine bis zu einer gewissen Konzentration hemmende Wirkung, die dann mit weiterer Steigerung der Carbamazepinbelastung wieder zurückgegangen wäre.

Nichts von beidem ist jedoch der Fall. Die Ursache für die verschiedenen Embryonenzahlen dürfte daher eher auf vermehrtes Algenwachstum zum Versuchsende oder ähnliche, systemimmanente Ursachen zurückgehen. Eine Wirkung des Carbamazepins kann anhand der vorliegenden Daten nicht nachgewiesen werden.

#### 4.2.6 Mortalität *P. antipodarum*

Carbamazepin führt zu keiner erhöhten Mortalität bei *P. antipodarum*. In keinem der behandelten Ansätze sind tote Schnecken zu verzeichnen gewesen. Lediglich im dritten Replikat der Lösemittelkontrolle waren zu Versuchsende nur noch 19 Tiere vorhanden, angesichts der nur wenig unterschiedlichen Embryonenzahlen ist ein Teil der erkannten Differenzen in den Embryonenzahlen auch auf diesen fehlenden Wert zurückzuführen. Ansonsten ist keine Mortalität zu bemerken. Somit wirkt Carbamazepin nicht in direkter Weise toxisch auf *P. antipodarum*.

### 4.3 Clofibrinsäure

#### 4.3.1 Emergenz *C. riparius*

Clofibrinsäure zeigt keine Wirkung auf die Entwicklung von *C. riparius*. In keinem der belasteten Ansätze ist ein Rückgang der Emergenz zu verzeichnen, es schlüpfen zwischen 77,5% und 88,8% der eingesetzten Larven. Die Lösemittelkontrolle zeigt niedrigere Emergenzwerte, erfüllt mit genau 70% Emergenz jedoch die Anforderungen der OECD-Richtlinie 218 (OECD 2004). Auch die Schlupfzeiten erfüllen die entsprechenden Kriterien, die Emergenz ist am Tag 23 komplett abgeschlossen. Die höchsten Schlupfraten zeigt die unbehandelte Kontrolle, die jedoch mit 90% nur knapp vor den 88,8% Schlupferfolg der Behandlungsstufen 0,9 und 2,7 mg/kg Sediment liegt. Ein Effekt des Lösemittels kann somit als ausgeschlossen gelten, zumal die erniedrigte Emergenzrate auf den geringen Schlupferfolg eines Einzelreplikates zurückgeht. Die weiteren Replikate weisen durchweg Emergenzraten

von 75–85% auf. Somit ist kein Einfluss von Clofibrinsäure auf die Emergenz von *C. riparius* nachweisbar.

#### 4.3.2 Mortalität *C. riparius*

Eine erhöhte Mortalität ist ebenfalls nicht zu verzeichnen. Die Kriterien nach OECD 218 (OECD 2004) werden eingehalten, die behandelten Ansätze unterscheiden sich nicht signifikant von der Lösemittelkontrolle.

#### 4.3.3 Gelegezahl *C. riparius*

Die Zahl der Gelege pro Weibchen unterscheidet sich in allen Ansätzen kaum voneinander. Die Eizahl pro Gelege bis auf die Behandlungsstufe 2,7 µg/l und die unbehandelte Kontrolle sind ebenfalls in allen Ansätzen weitgehend gleich. Auch die beiden genannten Ansätze weichen nicht signifikant von der Lösemittelkontrolle ab, auch wenn die Eizahl dort etwas niedriger liegt. Ein Effekt der Clofibrinsäure auf die durchschnittliche Eizahl in den Gelegen kann somit nicht erkannt werden.

#### 4.3.4 Vermehrung *L. variegatus*

Erneut fällt eine sehr niedrige Reproduktionsrate auf. Die höchste Vermehrungsrate wird mit 1,9 in den Ansätzen der Behandlungsstufe 0,9 mg/kg TG erreicht, alle weiteren Ansätze zeigen Raten zwischen 1,58 und darunter. In den unbehandelten Kontrollansätzen hat praktisch keine Vermehrung stattgefunden. In der Lösemittelkontrolle sind ebenfalls nur geringe Vermehrungsraten zu beobachten, jedoch sind die Unterschiede zu den belasteten Ansätzen geringer als bei der unbehandelten Kontrolle, signifikante Abweichungen finden sich nicht. Aufgrund der niedrigen Vermehrungsraten erscheinen die Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen stark betont, man erhält – vor allem bei getrennter Betrachtung der großen Würmer – auf den ersten Blick den Eindruck einer umgekehrten U-Kurve. Keiner der Werte ist jedoch signifikant von der Lösemittelkontrolle verschieden. Somit ist von einem zufälligen Ergebnis auszugehen. Die Ansätze unterscheiden sich bei genauer Betrachtung nur geringfügig, in der Gesamtübersicht zeigt sich außerdem, dass in den Ansätzen 0,1 und 0,3 mg/kg TG kein Anstieg, sondern vielmehr eine gegenüber der Kontrolle leicht abfallende Wurmzahl vorliegt. Somit ist die erhöhte Wurmzahl in der Kontrolle nicht als Folge der Testsubstanz, sondern als ein Einzelereignis zu sehen. Denkbar wäre eine fördernde Wirkung auf die Vermehrung, da sich Clofibrinsäure stimulierend auf Gewebebildung und somit auf Zellteilung auswirken kann (HANLEY ET AL. 1997). Im Schnitt haben sich jedoch lediglich zwei Würmer mehr geteilt. Wenn auch in den einzelnen Ansätzen teilweise größere Unterschiede auffallen, so ist doch angesichts der geringen Wurmanzahlen schon mit sehr geringen Differenzen ein auf den ersten Blick deutlicher Unterschied in einer Abbildung zu sehen. Von einem Effekt der Substanz kann somit nicht ausgegangen werden.

Die Gründe für die niedrigen Vermehrungsraten wurden bereits bei Betrachtung der Ergebnisse für Carbamazepin diskutiert. Auch hier fand der Versuch im Winter statt (Beginn 17.02.2003), so dass die niedrigen Reproduktionsraten zu einem gewissen Teil auch saisonal bedingt sein können. Für den Versuch sind sie zwar unbefriedigend, aber hinreichend, um zumindestens die Möglichkeit einer reproduktionstoxischen Wirkung der Clofibrinsäure ausschließen zu können. Eine reproduktionsfördernde Wirkung erscheint ebenfalls unwahr-

scheinlich. In der Behandlungsstufe 0,3 mg/kg TG liegt mit 3,7 der niedrigste Durchschnittswert an kleinen Würmern vor, die ja als Maß für eine gesteigerte Reproduktion gelten können. In der Behandlungsstufe 0,1 mg/kg TG liegen praktisch gleichviele junge Würmer vor. Eine Zunahme mit steigender Clofibrinsäurebelastung findet also nicht statt, nicht einmal auf dem geringen Reproduktionsniveau, das in diesem Versuch vorherrscht. In den Konzentrationen jenseits 0,9 mg/kg TG sinken die Reproduktionsraten wieder ab, so dass nicht von einer dosisabhängigen Wuchsförderung ausgegangen werden kann. Die erhöht scheinende Reproduktionsrate in der Behandlungsstufe 0,9 mg/kg TG muss als Zufallsergebnis gesehen werden, sie erlaubt nicht die Interpretation, dass hier Hormesis vorliegen könnte.

Somit kann keine Wirkung von Clofibrinsäure auf die Reproduktion von *L. variegatus* festgestellt werden.

#### 4.3.5 Mortalität *L. variegatus*

Eine erhöhte Mortalität kann in keinem der belasteten Ansätze festgestellt werden. Die geringste Anzahl an Würmern liegt in der unbehandelten Kontrolle vor. Hier ist die Zahl der eingesetzten großen Würmer jedoch praktisch konstant geblieben, der Rückgang von durchschnittlich 1,5 Tieren ist auf die Teilung einiger weniger Würmer zurückzuführen, die diesen Rückgang fast völlig ausgleicht. Alle übrigen Ansätze zeigen höhere Reproduktionsraten als die unbehandelte Kontrolle. Keine der Behandlungsstufen zeigt eine gegenüber der Lösemittelkontrolle erhöhte Mortalität, es sind nur geringfügig weniger Tiere vorhanden. Es gibt letztlich keine Anzeichen für erhöhte Mortalität, die Anzahl der großen Würmer ist im Wesentlichen konstant geblieben. Würde Clofibrinsäure eine erhöhte Mortalität unter Lumbriciden auslösen, hätte diese Zahl von Versuchsbeginn ab sinken müssen, die Reproduktionsrate wäre dann noch niedriger ausgefallen. Da die Lösemittelkontrolle ebenfalls nur geringe Zuwächse aufweist, wäre bei erhöhter Mortalität sogar eine negative Reproduktionsrate zu erwarten gewesen. Somit kann keine erhöhte Mortalität infolge der Clofibrinsäureexposition nachgewiesen werden.

#### 4.3.6 Embryonenzahl *P. antipodarum*

Auf den ersten Blick bietet die Embryonenzahl der letzten Untersuchung ein Bild, das auf eine Wirkung der Testsubstanz schließen lässt: Sämtliche belasteten Ansätze haben weniger unbeschaltete Embryonen als die Lösemittelkontrolle, in der Gesamtübersicht kommen in den Behandlungsstufen 0,04 µg/l, 1 µg/l und 25 µg/l weniger Embryonen als in der Lösemittelkontrolle vor. Bei Betrachtung der unbehandelten Kontrolle sowie der weiteren Auswertungen kann dieser Eindruck nicht bestehen bleiben: Die unbehandelte Kontrolle weist in dieser sowie in der vorangegangenen Auswertung signifikant mehr Embryonen auf als die Ansätze der Lösemittelkontrolle. Hinzu kommt, dass die weiteren Ansätze in der vierten Versuchswoche (Tag 28) durchweg mehr Embryonen als die Lösemittelkontrolle aufweisen, teilweise sogar signifikant mehr. Die Anzahl der beschalteten Embryonen liegt mit der Lösemittelkontrolle praktisch gleichauf, bei Betrachtung der unbeschalteten Embryonen sind teilweise signifikant höhere Zahlen als in der Kontrolle zu verzeichnen. Am deutlichsten signifikant ist jeweils die unbehandelte Kontrolle, die stets mehr Embryonen als die Lösemittelkontrolle aufweist. Dies ist auch bereits in der zweiten Versuchswoche zu sehen, hier finden sich in der unbehandelten Kontrolle signifikant mehr beschaltete Embryonen. In der Gesamtübersicht sind keine Unterschiede zu erkennen, die Betrachtung der unbeschalteten Embryonen zeigt

signifikante Differenzen zur Lösemittelkontrolle, in den Ansätzen 1,0 und 5,0 µg/l liegen weniger Embryonen vor.

Die über die ganze Versuchsdauer festgestellten höheren Embryonenzahlen in der unbehandelten Kontrolle gegenüber der Lösemittelkontrolle deuten auf eine Vorschädigung der ethanolbelasteten Ansätze hin. Tatsächlich wurde relativ früh im Versuchsverlauf ein Belag in den Versuchsgefäßen der behandelten Ansätze beobachtet, der auch bei Tausch der Versuchsgefäße wieder auftrat. Offensichtlich lag hier eine Infektion vor, möglicherweise durch Pilze, die durch Ethanol als Lösemittel begünstigt wurde. In den letzten Versuchswochen wurde diese Infektion offensichtlich so stark, dass die Reproduktionsleistung der Tiere beeinträchtigt wurde. Anders ist die permanente Differenz in den Embryonenzahlen von behandelter und unbehandelter Kontrolle nicht zu erklären.

Betrachtet man die Rückgänge der Embryonenzahlen im Vergleich zur Lösemittelkontrolle, ergibt sich kein Hinweis auf einen Substanzeffekt: In den Gesamtzahlen sind nur die Werte der niedrigsten und der höchsten Behandlungsstufe deutlich von der Lösemittelkontrolle verschieden, haben aber praktisch die gleiche Embryonenzahl. Die Werte der Behandlungsstufe 1,0 µg/l unterscheiden sich nur geringfügig, die der beiden verbliebenen Behandlungsstufen gar nicht. In den drei Behandlungsstufen 0,2, 1,0 und 5,0 µg/l ist sogar eine gegenüber den übrigen Behandlungsstufen erhöhte Embryonenzahl festzustellen. Vor diesem Hintergrund ist nicht von einer Substanzwirkung auszugehen. Hormesis liegt ebenfalls nicht vor, da ansonsten von einer merklich erhöhten Embryonenzahl in den mittleren Ansätzen auszugehen wäre. Aufgrund von Berichten über östrogene Effekte von Clofibrinsäure (XU ET AL. 2001) wäre ohnehin eher mit erhöhten Embryonenzahlen zu rechnen gewesen.

Somit bleibt festzuhalten, dass in der letzten Versuchswoche zwar deutlich niedrigere Embryonenzahlen in den belasteten Ansätzen auftreten. Es kann jedoch nicht mit hinreichender Sicherheit von einem Substanzeffekt ausgegangen werden, die wahrscheinlichere Ursache sind Schädigungen durch die eingetretene Infektion. Die praktisch gleichen Embryonenzahlen in Lösemittelkontrolle und behandelten Ansätzen während der ersten vier Versuchswochen bei gleichzeitiger Reduzierung gegenüber der unbelasteten Kontrolle lassen diese Interpretation stichhaltig erscheinen. Später eingetretene signifikante Reduzierungen gegenüber der Lösemittelkontrolle sind somit als Artefakte zu sehen, nicht als Schädigung durch Clofibrinsäure. Ein Effekt auf die Embryonenzahlen ist somit nicht gegeben.

Eine erhöhte Mortalität ist nicht zu verzeichnen. Zum Ende des Versuches waren in jedem Versuchsansatz noch 20 Tiere vorhanden. Die Mortalität liegt somit in allen Versuchsansätzen bei 0%.

## 4.4 Ciprofloxacin

### 4.4.1 Emergenz *C. riparius*

In allen Ansätzen bis auf die Behandlungsstufe 2,0 µg/kg TG liegt eine normale Emergenz mit Werten über 70 % vor. Lediglich der genannte Ansatz hat eine Emergenzrate von 62,5%, dies wird jedoch durch einen niedrigen Wert in einem Einzelreplikat bedingt, in dem nur eine Emergenz von 25% erzielt wird. Dies ist jedoch angesichts der hohen Emergenzraten in den übrigen Replikaten eindeutig nicht auf einen Einfluss von Ciprofloxacin zurückzuführen. Einzig bemerkenswert ist, dass noch am 27. Tag nach Einsetzen der Larven einzelne Tiere

schlüpfen. Gemäß der OECD-Richtlinie 218 sollte der Schlupf an diesem Tag eigentlich bereits beendet sein. Gegenüber den anderen Versuchen ist außerdem eine Verzögerung des Schlupfbeginns um drei Tage zu verzeichnen. Die Ursache für diese Verzögerung ist nicht zu erkennen. Die reine Dauer der gesamten Emergenz ist trotz dieser Verschiebung unverändert. Da die Verschiebung auch in der Kontrolle auftritt, kann sie nicht substanzbedingt sein.

Somit erlaubt der Versuch trotz einer verzögerten Emergenz die Aussage, dass Ciprofloxacin keine negativen Auswirkungen auf die Emergenz von *C. riparius* hat. In sämtlichen Ansätzen liegen (das ausgefallene Replikat in der Behandlungsstufe 2,0 µg/kg TG ausgeklammert) Schlupferfolge über 70 % vor, signifikante Unterschiede sind nicht zu sehen. In der Behandlungsstufe 0,5 µg/l ist mit 93,8% sogar ein etwas höherer Wert als in der Kontrolle zu verzeichnen. Die Emergenz von *C. riparius* ist unter Einfluss von Ciprofloxacin somit nicht gefährdet.

#### 4.4.2 Mortalität *C. riparius*

Die Mortalität erfüllt die Validitätskriterien der OECD-Richtlinie 218 (OECD 2004). Vereinzelt kommt es zu höheren Ausfällen in der Larvalentwicklung, doch werden insgesamt nie 30% Mortalität überschritten, ausgenommen die bereits diskutierte Behandlungsstufe 2,0 µg/kg TG. Da sich auch im Akuttest keine erhöhte Mortalität gezeigt hat, kann festgestellt werden, dass Ciprofloxacin für Larven von *C. riparius* nicht toxisch ist.

#### 4.4.3 Gelegezahl *C. riparius*

Unterschiede in der Anzahl der Gelege pro Weibchen sind nicht ersichtlich. Trotz Unterschieden von 0,2 Gelegen pro Weibchen zwischen den einzelnen Behandlungsstufen wird keine der Differenzen im Test als signifikant erkannt. Die Kontrolle und die Behandlungsstufe 1,0 µg/kg TG liegen praktisch gleichauf, die anderen Ansätze zeigen nur geringfügig niedrigere Zahlen. Trotz der niedrigen Mückenanzahl in einem der Replikate weist auch die Behandlungsstufe 2,0 µg/kg TG keinen signifikant niedrigeren Wert auf, ein Einfluss von Ciprofloxacin auf die Fruchtbarkeit liegt, gemessen an diesem Parameter, nicht vor.

Auch die Eizahl pro Gelege ist nicht beeinflusst, sie ist in allen Ansätzen nicht signifikant verschieden. Die größte Differenz zeigt sich zwischen den Behandlungsstufen 0,25 µg/kg TG und 4,00 µg/kg TG mit einem Unterschied von 61 Eiern.

Ein Effekt von Ciprofloxacin auf die Fruchtbarkeit von *C. riparius* ist nach Lage der Daten nicht gegeben.

#### 4.4.4 Vermehrung *L. variegatus*

Aufgrund der sichtlich, wenn auch nicht signifikant geringeren Embryonenzahl in den beiden höchstbelasteten Behandlungsstufen wurde der Versuch einmal wiederholt. Ein Effekt des Ciprofloxacins, der auf den ersten Blick möglich erschien, konnte jedoch nicht belegt werden.

Somit kann die beobachtete Entwicklung bei den Wurmzahlen nicht auf eine Wirkung des Ciprofloxacins zurückgeführt werden, die Nullhypothese kann nicht abgelehnt werden. Besonders aufgrund der hohen Standardabweichungen in der Kontrolle ist es nicht möglich, die These einer Reproduktionshemmung durch das getestete Antibiotikum zu unterstützen.

Die Biomasse pro Wurm zeigt ebenfalls keinen Einfluss der Testsubstanz. Sie ist in der Kontrolle erwartungsgemäß niedrig, da hier vergleichsweise mehr Würmer mit dem gleichen Nahrungsangebot auskommen müssen, jedoch liegt auch in der Behandlungsstufe 1,0 µg/l eine niedrige Biomasse vor, obwohl hier bereits weniger Würmer vorhanden sind. Die übrigen Biomassezahlen sind kaum verschieden und stehen zu den Zahlen der Würmer in keinem Verhältnis. Sie lassen keine Einwirkung der Versuchssubstanz erkennen.

Zur Überprüfung der Ergebnisse erfolgte der zweite Versuchsdurchgang. Hier scheint auf den ersten Blick ein dem ersten Versuch zumindestens ähnliches Ergebnis vorzuliegen, die beiden höchstbelasteten Behandlungsstufen weisen erneut die niedrigsten Wurmzahlen auf. Insgesamt weist dieser Versuch die höchste Gesamtzahl an Würmern auf, die in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen erreicht wurde. Auch die Standardabweichungen in der Kontrolle sind merklich geringer, in den höchstbelasteten Behandlungsstufen allerdings höher als im ersten Durchgang.

Ein signifikanter Unterschied in den Wurmzahlen kann erneut nicht nachgewiesen werden. Zwar sind wiederum Rückgänge der Anzahl mit steigender Ciprofloxacinkonzentration zu sehen, doch nicht mehr in einer Weise, die eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung suggerieren könnte. Die Behandlungsstufe 0,25 µg/l zeigt sogar geringfügig mehr Würmer als die Kontrolle, die beiden folgenden praktisch genauso viele Würmer. Erst die Behandlungsstufen 2,0 und 4,0 µg/kg TG zeigen einen Rückgang der Wurmanzahl, der hier nicht so prägnant ausfällt wie im ersten Versuch.

Des Weiteren zeigt sich, dass in diesem Versuch offensichtlich nicht die neugebildeten Würmer für den Eindruck in der Gesamtübersicht verantwortlich sind, da deren Zahl weitgehend gleich erscheint. Bis auf einen geringfügig höheren Wert in der Behandlungsstufe 1,0 µg/kg TG liegen alle Werte praktisch auf einem Niveau. Stärkere Differenzen zeigen sich vielmehr bei den adulten Würmern, hier finden sich in den Behandlungsstufen 0,5, 2,0 und 4,0 µg/kg TG deutliche niedrigere Wurmzahlen als in der Kontrolle, in den beiden letzten Behandlungsstufen sind die Unterschiede signifikant. Dieses Ergebnis weist jedoch allenfalls auf höhere Teilungsaktivitäten hin, die mit einer geringfügig erhöhten Mortalität, möglicherweise aufgrund von nicht ausreichender Nahrung, gekoppelt sein könnte. Es ist kein Effekt des Ciprofloxacins zu sehen. Die Theorie einer höheren Reproduktionsrate unter Stress durch schlechte Umweltbedingungen (sog. r-Strategie) kann hier nicht angenommen werden, da die Ergebnisse des ersten Versuchs dem zuwiderlaufen.

Denkbar wäre eine erhöhte Teilung, da Ciprofloxacin Apoptose induzieren kann (HEROLD ET AL. 2002) und somit auch Teilungen der Würmer auslösen könnte. Es ist jedoch nach gegenwärtiger Datenlage nicht von einem Effekt des Ciprofloxacins bei den getesteten Konzentrationen auszugehen. Von einer Untersuchung möglicher Effekte bei noch höheren Testkonzentrationen wurde abgesehen, da hier eine Umweltrelevanz nicht mehr wahrscheinlich ist. Bei den gegenwärtig anzunehmenden Umweltkonzentrationen von Ciprofloxacin ist somit nicht von einer Gefahr für *L. variegatus* oder verwandte Arten auszugehen.

Auch aus der Biomasse pro Wurm ergibt sich kein Hinweis auf eine Gefährdung durch Ciprofloxacin. Die Werte sind aufgrund der hohen Wurmzahlen in den Testansätzen generell

niedrig, doch nirgends signifikant verschieden. Einzig der besonders niedrige Wert in der Behandlungsstufe 2,0 µg/kg TG fällt etwas aus dem Rahmen, da er im Gegensatz zu dem vergleichbaren Wert in der Behandlungsstufe 0,5 µg/kg TG nicht durch eine hohe Wurmzahl erklärt werden kann. Es liegt jedoch kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle vor. Außerdem zeigt der höhere Wert in der Behandlungsstufe 4,0 µg/kg TG, dass ein Substanzeffekt unwahrscheinlich ist.

Ein Effekt von Ciprofloxacin auf *L. variegatus* ist also angesichts der vorhandenen Datenlage nicht belegbar. Erforderlich sind jedoch Versuche mit höheren Testkonzentrationen, um zu klären, ob in den hier durchgeführten Versuchen möglicherweise gerade die Wirkschwelle erreicht wurde.

#### 4.4.5 Embryonenzahl *P. antipodarum*

Bei den ersten beiden Auswertungen wird kein zur Kontrolle signifikanter Unterschied der Embryonenzahlen in den behandelten Ansätzen zur Kontrolle festgestellt. Sämtliche Embryonenzahlen liegen auf vergleichbarem Niveau und weichen nicht voneinander ab. Erst in der letzten Auswertung zeigt sich ein Unterschied: Die höchste Behandlungsstufe, 0,8 µg/l, weist signifikant weniger Embryonen auf als die Kontrolle. Dieser Unterschied spiegelt sich sowohl in der Gesamtembryonenzahl als auch in der separaten Betrachtung von beschalten und unbeschalten Embryonen wider.

Da die Differenz jedoch nur 3,84 Embryonen insgesamt beträgt, ist ein tatsächlicher Effekt der Substanz hier noch nicht mit ausreichender Sicherheit anzunehmen. Denkbar ist sowohl ein mit überschrittener Wirkschwelle einsetzender Substanzeffekt als auch eine zufällige Differenz, die nur aufgrund der ansonsten sehr konstanten Embryonenzahlen als signifikant auffällt.

Zu bemerken ist auch, dass die Embryonenzahl in allen Ansätzen zunimmt, in den behandelten sogar mehr als in der Kontrolle. Erst in der letzten Behandlungsstufe tritt keine Zunahme auf. Mindestens diese Ciprofloxacin-Konzentrationen sind also ohne Einfluss auf *P. antipodarum*. Ob nun ein Rückgang um durchschnittlich 2,7 Embryonen gegenüber der letzten Auswertung tatsächlich einen Substanzeffekt darstellt, kann daher nicht ohne Weiteres angenommen werden, zumal sich ein solcher Effekt in den vorherigen Auswertungen nicht andeutete. Zum Vergleich sei gesagt, dass das Antidepressivum Fluoxetin bereits nach vierzehn Tagen deutliche Effekte zeigte, *Potamopyrgus* also sehr rasch auf Belastungen reagieren kann.

Ein Effekt der Testsubstanz kann nicht sicher erkannt werden. Zudem wiesen MAGGIOLO ET AL. (1991) nach, dass Ciprofloxacin keinen Effekt auf das weibliche Sexualhormonsystem beim Menschen hat. Eine Wirkung auf die Embryonenbildung bei *Potamopyrgus* ist daher nicht wahrscheinlich. Erforderlich wären weitere Untersuchungen in einem höheren Konzentrationsbereich und einen längeren Zeitraum, um festzustellen, ob hier nur eine geringfügige Schwankung vorliegt oder es sich um eine einsetzende Wirkung des Ciprofloxacins handelt.

Auch eine erhöhte Mortalität ist nicht gegeben. Bis zum Versuchsende wurden keine toten Tiere in den Testgefäßen gefunden, auch bei der letzten Auswertung standen pro Testgefäß je 20 Tiere zur Verfügung. Somit überlebten sämtliche Schnecken.



## 4.5 Fluoxetin

### 4.5.1 Emergenz *C. riparius*

Es ist nicht von einer Beeinflussung der Emergenz von *C. riparius* durch Fluoxetin auszugehen. Bis auf die höchste Behandlungsstufe liegen alle Emergenzraten fast gleichauf und durchweg über 90%. Eine Beeinflussung ist hier nicht gegeben. Die signifikante Abweichung in der höchsten Behandlungsstufe erklärt sich durch die etwas niedrige Emergenzrate eines Einzelreplikats. Auch in diesem Replikat ist die Emergenz mit 70% sehr hoch und nicht erkennbar von Fluoxetin beeinflusst. Die signifikante Differenz ergibt sich nur, da im Vergleich zu den übrigen, sehr hohen Emergenzraten auch eine solche Differenz bereits als signifikant eingestuft wird. Ein Substanzeffekt kann als ausgeschlossen gelten. Dies läuft den Ergebnissen von BROOKS ET AL. (2003A) zuwider, die eine erhöhte Larvalmortalität bei *C. tentans* festgestellt hatten, allerdings bei deutlich höheren Konzentrationen (LC<sub>50</sub>: 15,2 mg/kg Sediment). Möglicherweise ist *C. riparius* gegenüber Fluoxetin unempfindlicher.

### 4.5.2 Mortalität *C. riparius*

Eine erhöhte Mortalität liegt ebenfalls nicht vor. In den behandelten Ansätzen kommen von zwanzig eingesetzten Larven maximal zwei nicht zum Schlupf, vielfach schlüpfen alle eingesetzten Larven. Die Überlebensrate ist somit nicht beeinträchtigt. Auch der Ausfall von sechs Tieren in einem Replikat der höchsten Behandlungsstufe ist ein Zufallsereignis und nicht als Substanzeffekt zu sehen. In diesem Replikat schlüpfen immer noch 70% der eingesetzten Larven, somit liegt hier ein sehr gutes Schlupfergebnis vor. Die weiteren Replikate sind nicht betroffen, so dass kein Fluoxetineffekt vorliegt.

### 4.5.3 Gelegezahl *C. riparius*

Da die Gelege für alle Weibchen einer Behandlungsstufe gepoolt wurden, um die Fertilität zu untersuchen (sämtliche, auch die Kontrollgelege erwiesen sich als infertil), kann keine Varianzanalyse der Gelegezahl pro Weibchen durchgeführt werden. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsstufen betragen jedoch nur maximal 0,17 zwischen der Kontrolle und der Behandlungsstufe 0,38 mg/kg TG. Dies ist kein übergroßer Unterschied; da in der höchsten Behandlungsstufe zudem 0,11 Gelege mehr gezählt werden, ist auch hier nicht von einem Substanzeffekt, sondern von den in diesem Versuch üblichen Schwankungen auszugehen. Die Gelegezahl pro Weibchen ist durch Fluoxetin somit nicht beeinflusst.

Die Eizahl pro Gelege unterliegt starken Schwankungen. Signifikant von der Kontrolle unterscheidbar ist nur die höchste Behandlungsstufe, hier liegen mehr Eier pro Gelege vor. Ein negativer Effekt des Fluoxetins auf die Gelegebildung besteht also nicht. Auch eine fördernde Wirkung ist nicht ersichtlich, da die weiteren Behandlungsstufen keine Tendenz in diese Richtung erkennen lassen. Fluoxetin hat somit keinen Einfluss auf die Zahl der Gelege pro Weibchen und die Gelegegröße.

#### 4.5.4 Vermehrung *L. variegatus*

Die Wurmzahlen in der Kontrolle und den belasteten Ansätzen zeigen einen Verlauf, der an Hormesis denken lässt. In den Behandlungsstufen 0,94 mg/kg TG und 2,34 mg/kg TG sind signifikant mehr Würmer vorhanden als in der Kontrolle. Die vorgelagerten Behandlungsstufen zeigen bereits eine mit zunehmender Substanzgabe ansteigende Wurmzahl, in der höchsten Behandlungsstufe sind erneut weniger Würmer zu finden.

Passend hierzu nimmt die Anzahl der adulten Würmer mit steigender Substanzkonzentration ab, in der Behandlungsstufe 0,94 mg/kg TG ist der Unterschied signifikant. In den folgenden Behandlungsstufen nimmt die Anzahl wieder zu. Die Zahlen der neugebildeten Würmer zeigen eine ähnliche Tendenz wie die Gesamtzahlen mit signifikant mehr Würmern in der Behandlungsstufe 0,94 mg/kg TG. Dies weist auf einen fördernden Effekt des Fluoxetins auf die Reproduktion von *L. variegatus* hin. Zwar bedürfen die Ergebnisse der Bestätigung in einem zweiten Durchgang, da die Validitätskriterien, die von EGELER ET AL. (2005) postuliert wurden, nicht erreicht werden. Nach den vorliegenden Resultaten jedoch führt Fluoxetin in geringen Konzentrationen zu einer erhöhten Teilungsrate bei den Würmern. Zwei mögliche Erklärungen sind denkbar. Zum einen ist denkbar, dass Fluoxetin unspezifischen Schadstoffstress auf die Würmer ausübt und diese daraufhin mit einer verstärkten Produktion von Nachkommen reagieren, um die Population bis zu einer Besserung der Situation zu erhalten (r-Strategie). Erneut sinkende Wurmzahlen bei höheren Konzentrationen wären dann durch Toxizität des Fluoxetins zu erklären.

Als zweite Erklärung bleibt ein tatsächlicher Effekt des Fluoxetins auf die Reproduktion. Da Anneliden serotonerge Neuronen besitzen (HESSLING ET AL. 1999), ist es möglich, dass ein durch gehemmte Rückaufnahme erhöhter Serotoninlevel in den Synapsen Effekte auf die Versuchstiere auslöst. WILLIAMS & HERRUP (1988) berichten von mitogener Wirkung durch Serotonin. Eine gesteigerte Proliferationsrate könnte in den sich asexuell fortpflanzenden *L. variegatus* zu einer erhöhten Reproduktion führen, da so eine häufigere und schnellere Teilung der Würmer ausgelöst werden könnte. Der bei weiter steigender Fluoxetinkonzentration eintretende Rückgang der Wurmzahlen ist möglicherweise auf eine toxische Wirkung des Fluoxetins oder des überhöhten Serotoninlevels zurückzuführen. RICHARDS ET AL. (2004) berichten beispielsweise von einer vasokonstriktorischen Wirkung des Fluoxetins, so beispielsweise wäre eine erhöhte Mortalität zu erklären. Auch FONG (1998) nennt ähnliche Effekte, hier führt Fluoxetin in niedrigen Konzentrationen zu einer Induktion des Abblaus, in höheren Konzentrationen verliert sich dieser Effekt wieder. UHLER ET AL. (2000) berichten von einer Induktion rotierender Bewegungen der Embryonen von *Physa elliptica* durch Fluoxetin. Auch dieser Effekt verliert sich bei steigenden Fluoxetinkonzentrationen. Es ist offensichtlich typisch für die Wirkung von Fluoxetin, dass sich bei niedrigen Konzentrationen induzierte Effekte mit steigender Substanzgabe wieder verlieren.

#### 4.5.5 Embryonenzahl *P. antipodarum*

Bereits bei der ersten Auswertung zeigen sich in den behandelten Ansätzen signifikante Differenzen zur Kontrolle. Ein Substanzeffekt ist hier im Gegensatz zu den übrigen Versuchen unstrittig, da die Differenzen früh auftreten und klar mit der Konzentration der Testsubstanz in Zusammenhang stehen. Die Zahlen der Embryonen sinken mit zunehmender Substanzmenge, außerdem bleibt der Effekt über die ganze Versuchsdauer bestehen. In späteren Auswertungen sinkt die Embryonenzahl auch bei Tieren, die geringeren Fluoxetinkonzentrationen ausgesetzt waren, gegenüber der Kontrolle signifikant ab. Zum Ende des Ver-

suchs sind bereits bei der zweitniedrigsten Testkonzentration 3,2 µg/l Effekte zu sehen. Die Konzentrations-Wirkungsbeziehung bleibt jedoch über die gesamte Versuchsdauer erhalten, und der Effekt kehrt immer in den gleichen Ansätzen wieder. Es ist somit nicht von zufälligen Effekten auszugehen. Hinzu kommt die Lähmung der Schnecken in den mit 400 µg/l belasteten Ansätzen. Dieser Befund deckt sich mit den Beobachtungen von FONG (1998), wonach die Vitalität von Zebrauscheln (*Dreissena polymorpha*) bei hohen Fluoxetinkonzentrationen beeinträchtigt wurde.

Der Rückgang der Embryonenzahlen steht im Einklang mit den bisher vorliegenden Beobachtungen, nach denen Fluoxetin die Reproduktion von Mollusken beeinflusst. Bei *D. polymorpha* wird durch Fluoxetin ein verfrühtes Ablaichen ausgelöst. Da sich die Larven nur bei geeigneten Umweltbedingungen entwickeln können, ist verfrühtes Ablaichen nicht etwa als fortpflanzungsfördernd, sondern vielmehr als Gefährdung der Population zu betrachten.

Bei den parthenogenetischen *P. antipodarum* liegt mit der Abnahme der Embryonenzahl ein eindeutig negativer Effekt vor. Die Neubildung von Embryonen wird direkt gehemmt. Eine mögliche Beschleunigung der Embryonenproduktion, die auf lange Sicht nach Erschöpfung des Eizellenvorrates zu einer Senkung der Embryonenzahl geführt hätte, ist nicht zu beobachten. Die Zahl der Embryonen in den belasteten Ansätzen ist durchweg niedriger als in der Kontrolle, zu keinem Zeitpunkt ist sie erhöht. Ein solcher Unterschied ist jedoch aufgrund der verschiedenen Fortpflanzungsweisen beider Arten leicht verständlich. Zudem sind die durch Fluoxetin ausgelösten Schadeffekte vielfältig und nicht auf eine Art oder ein spezielles Organsystem beschränkt. RICHARDS ET AL. (2004) berichten über eine erhöhte Mortalität unter fluoxetinxponierten Sonnenfischen (*Lepomis gibbosus*). Die Mechanismen der Toxizität sind hierbei unklar. Auch FONG (1998) gibt keinen Hinweis auf die genauen Mechanismen der von ihm dokumentierten Laichinduktion.

In Laborversuchen werden vielfältige Schadeffekte von Fluoxetin beobachtet. So fanden BROOKS ET AL. (2003A) toxische Effekte bei *Chironomus tentans*, COUPER UND LEISE (1996) fanden Metamorphoseninduktion bei Gastropodenlarven. Ein einziger Wirkmechanismus kann hier kaum zugrunde liegen. Bekannt sind Effekte auf das Blutgefäßsystem (RICHARDS ET AL. 2004). Wenn hieraus auf Effekte auf die Muskulatur geschlossen werden kann, wäre dies ein möglicher Grund für die verstärkte Freisetzung von Embryonen, da so eine veränderte Peristaltik in Eileiter und Brutkammer denkbar wäre.

Es liegen außerdem Berichte über verstärkte Cilienaktivität in den Zellen von Gastropoden vor (FONG 2001, UHLER ET AL. 2000). Speziell UHLER ET AL. (2000) berichten über durch Serotonin oder Fluoxetin verstärkte Cilienaktivität bei den Embryonen von *Physa elliptica*. Ein ähnlicher Effekt könnte auch für die rückläufige Embryonenzahl in *P. antipodarum* verantwortlich sein. Bei der Auswertung fielen verstärkt koagulierte Embryonen auf (Beobachtung von HECKER, 2004). Durch eine möglicherweise induzierte Rotation wäre eine gestörte Entwicklung denkbar. UHLER ET AL. (2000) beobachteten nur unmittelbare Effekte auf Eigelege, die Effekte traten bei Konzentrationen im Bereich von  $10^{-5}$  M (3,09 mg/l) auf. Eine Langzeitexposition erfolgte nicht. Es ist mehr als wahrscheinlich, dass eine künstlich induzierte Rotation sich bei längerer Dauer auf die Entwicklung der Embryonen auswirkt, allein durch den erhöhten Energieverbrauch. Des weiteren ist auch bei den adulten Schnecken eine verstärkte Cilienbewegung möglich, laut FONG (2001) werden diese Bewegungen in einer Reihe von Taxa durch Serotonin beziehungsweise Fluoxetin stimuliert. So wäre ein vorzeitiger Ausstoß der Embryonen ebenso möglich.

Ein weiterer Grund wäre eine tatsächliche indirekte hormonelle Wirkung. Die Arbeiten von KRANTIC ET AL. (1991) zeigen, dass Mollusken über Serotoninrezeptoren verfügen. Ein erhöhter Serotoninlevel infolge der Wiederaufnahmehemmung durch Fluoxetin könnte somit hormonell gesteuerte Effekte induzieren. Der genaue Grund des beobachteten Effektes kann jedoch an dieser Stelle nicht geklärt werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sich Fluoxetin negativ auf die Reproduktion von *P. antipodarum* auswirkt. Der Effekt tritt bereits bei der ersten Auswertung zutage, er dauert während des ganzen Versuchs an. Zum Ende hin intensiviert sich die Wirkung. Während bei den Versuchen mit den übrigen Substanzen nur wenige, eher zufällig erscheinende Schwankungen der Embryonenzahlen zu sehen waren, liegt ein eindeutiger Effekt der Versuchssubstanz vor.

#### 4.5.6 Mortalität *P. antipodarum*

Fluoxetin wirkt auf *P. antipodarum* in einer Konzentration von 400 µg/l zunächst toxisch durch Lähmung. Die Tiere waren zwar bei Eintreten der Wirkung noch lebendig, lagen aber bewegungsunfähig am Boden des Versuchsgefäßes. Da sie über weite Teile der Versuchszeit in diesem Zustand verblieben und erst gegen Ende des Tests starben, ist Verhungern als todesursächlich anzusehen. Eine direkte Toxizität ist bei diesen Konzentrationen noch nicht gegeben, doch wäre die Art bei einer permanenten Exposition gegenüber solchen Konzentrationen akut gefährdet. Direkte toxische Gefahr ist bei den in der Umwelt gemessenen Konzentrationen jedoch nicht gegeben. Bei einer real gemessenen Konzentration von 345 µg/l und Beaufschlagung eines Sicherheitsfaktors von 50 gemäß des Technical Guidance Documents (TGD) (ECB 2003) ist nach den vorliegenden Daten eine PNEC von 6,9 µg/l gegeben. Diese Konzentration wird nach den aktuell vorliegenden Messdaten (KOLPIN ET AL. 2002, BROOKS ET AL. 2003A) bei weitem nicht erreicht. Bei der diesem Wert am nächsten gelegenen Konzentration im Versuch, 16 µg/l, konnte nach Augenschein keine Wirkung auf die Bewegung der Schnecken festgestellt werden. Es ist jedoch denkbar, dass die Reduzierung der Embryonenzahl zusätzlich zu den oben diskutierten direkten Wirkungen auf die Embryonen außerdem auf eine beeinträchtigte Nahrungsaufnahme zurückgeht. Ergänzende Untersuchungen, beispielsweise Verhaltensversuche in einer Fließrinne, könnten hier näheren Aufschluss geben. Für entsprechende Untersuchungen lagen im Labor jedoch nicht die nötigen technischen Voraussetzungen vor. Eine Durchführung solcher Versuche in geeigneten Anlagen wäre wünschenswert, da sie weiteren Aufschluss über die tatsächliche Ursache der Verringerung der Embryonenzahlen geben wird.

Die vorliegenden Daten lassen eine weitere Beobachtung des Umweltverhaltens von Fluoxetin als dringend geboten erscheinen, da das Medikament offenbar massiv in den Stoffwechsel von Invertebraten, besonders Mollusken, sowie Vertebraten eingreifen kann. Durch die beobachtete lähmende Wirkung auf Mollusken sind auch über Zeiträume von weit mehr als acht Wochen Effekte wie etwa herabgesetzte Fertilität denkbar.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Fluoxetin nach vorhandener Datenlage ein erhebliches Risikopotenzial besitzt.

## 4.6 Destruentenmikrokosmos

Die Versuche mit dem Destruentenmikrokosmos zeigen für alle Substanzen sehr dissonante Resultate. Grundsätzlich ist zu sagen, dass anhand der vorliegenden Daten kein Effekt einer der getesteten Substanzen zu erkennen ist.

In den Versuchen mit Carbamazepin fällt auf, dass außer in Wiederholung B die Zelldichten von *Tetrahymena* nur bis zum Zeitpunkt  $t_{24}$  ansteigen und dann nur noch geringfügig schwanken. Offensichtlich stellt sich ein Gleichgewicht zwischen *Tetrahymena* als Primärkonsumenten einerseits sowie den *Blepharisma* andererseits ein, die als Bakterivore in direkter Nahrungskonkurrenz mit *Tetrahymena* stehen und auch *Tetrahymena* direkt fressen. Angesichts der geringeren Dichte von *Blepharisma* in Wiederholung B ist die höhere Dichte von *Tetrahymena* verständlich; hier spielt sich das Gleichgewicht offensichtlich auf höherem Niveau ein. Es ist davon auszugehen, dass die Differenzen zufällig sind, ein Effekt des Carbamazepins ergibt sich nicht aus ihnen. In der Positivkontrolle zeigt sich in den Wiederholungen A und D ein Absinken der Zelldichte gegenüber dem Nullwert, gefolgt von einem leichten Anstieg während der weiteren Versuchsdauer. In den Wiederholungen B und C ist der Verlauf uneinheitlich, am Ende werden auch hier höhere Zelldichten als zu Beginn gemessen. Dies deutet auf eine Anpassung von *T. thermophila* an Cadmium hin.

In den Versuchen mit Clofibrinsäure und Ciprofloxacin wurde eine geringere Cadmiumkonzentration benutzt. Hier starb *Blepharisma* nicht völlig ab, die Zahlen nahmen am Versuchsende wieder leicht zu. Es zeigt sich, dass *Blepharisma* sich auf Dauer an eine Cadmiumbelastung anpassen kann, auch wenn die Reproduktionsraten deutlich erniedrigt sind.

In Wiederholung B steigen die Zelldichten von *Tetrahymena* bis zum Versuchsende an. Da sich in dieser Wiederholung parallel die höchsten Zahlen an *Blepharisma* finden, kann nicht der geringere Fraßdruck und die fehlende Nahrungskonkurrenz die Ursache sein. Eine mögliche Erklärung ist, dass zur Produktion des Nahrungskonzentrats eine jüngere Kultur von *Tetrahymena* verwendet wurde, so dass in den Ansätzen mehr Nährstoffe vorhanden waren.

Auftretende signifikante Unterschiede sowohl in der Zellzahl von *Blepharisma* als auch in der Extinktion der Testsubstanz, die als Maß für die Anzahl der *Tetrahymena* bestimmt wurde, sind durchweg in den Wiederholungen der Versuche nicht reproduzierbar und treten auch jeweils nur bei einzelnen Auswertungen auf. Lediglich bei Ciprofloxacin ist in der Behandlungsstufe 1200 ng/l nach 24 und 48 Stunden über zwei Auswertungen eine bleibende signifikante Erniedrigungen der *Blepharisma*-Anzahl festzustellen. Dieser Effekt ist jedoch in den folgenden Auswertungen und im zweiten Versuchsdurchgang nicht reproduzierbar. Die im vorigen Versuch noch als signifikant aufgefallene Behandlungsstufe weist lediglich einmal weniger *Blepharisma* als die Kontrolle auf. Es können somit keine Effekte der Testsubstanzen auf die getesteten Einzeller festgestellt werden.

Auch die Versuche mit Fluoxetin erbrachten keine Resultate, die auf eine Substanzwirkung schließen lassen. Zwar wurden im zweiten Versuchsdurchgang höhere Reproduktionsraten gemessen. Hierzu ist jedoch anzumerken, dass der erste Versuch zu einem Zeitpunkt stattfand, zu dem das Versuchsdesign noch nicht endgültig feststand. Spätere Verbesserungen können die Ursache der verbesserten Reproduktionsrate sein. Fluoxetin hat offensichtlich weder einen beschleunigenden noch einen verlangsamenden Einfluss.

Auch für *Tetrahymena* muss angesichts der schwankenden Werte der Zelldichte und der wechselnd gegenüber der Kontrolle signifikant erhöhten und geringeren Werte sowie der differierenden Resultate beider Versuche von zufälligen Resultaten ausgegangen werden.

Der Ansatz, mit Ciliaten Effekte von Pharmaka in der Umwelt zu untersuchen, ist jedoch prinzipiell sinnvoll. So liegen Daten vor, die direkte Effekte von Serotonin in *T. thermophila* belegen und eine – nicht geklärte – Funktion dieses Hormons im Stoffwechsel dieser Einzeller andeuten: RODRIGUEZ & RENAUD (1980) zeigen, dass Serotonin die Cilienregeneration bei *T. thermophila* beschleunigt, denen die Cilien vorher durch chemische Behandlung entfernt worden waren. Der genaue Wirkmechanismus ist nicht bekannt. Da Fluoxetin häufig Serotonin-mimetisch wirkt, wären Effekte dieses Medikaments sehr wohl denkbar. In gleicher Weise könnten auch Carbamazepin und Clofibrinsäure rezeptorvermittelte Effekte ausüben. Gerade Clofibrinsäure, die in Verdauungsprozesse eingreift (MUTSCHLER 1991), könnte sich auch in Protisten auf die Nährstoffaufnahme auswirken. Die vorliegenden Daten belegen solche Annahmen jedoch nicht.

Für Einzeller könnten Effekte auf die Bakterienflora relevant sein: HARTMANN ET AL. (1999) berichten von DNA-Veränderungen in den in Krankenhausabwässern gefundenen Bakterien. Anders als die direkten Medikamentenrückstandskonzentrationen, die im weiteren Verlauf der Abwassersammlung zum Teil deutlich sinken, können die DNA-Veränderungen auch über weite Strecken konstant weitergegeben werden und so möglicherweise die Zusammensetzung der Bakterienflora im Wasser beeinflussen. Auf diese Weise könnten nachteilige Effekte für bakterivore Einzeller entstehen, da über die Einflüsse anthropogener Umweltveränderungen auf die Bakterienflora von Gewässern nur wenige Informationen vorliegen (HIORNS ET AL. 1997).

Eine direkte toxische Wirkung von Antibiotika auf Einzeller ist dagegen nicht notwendigerweise anzunehmen. Beispielsweise berichten MARTI ET AL. (1979) von der Beimischung von Penicillin in das Kulturmedium von *Blepharisma*, um dessen Qualität zu verbessern. Ausweislich mikroskopischer Überprüfung nahmen die Einzeller bei Penicillin-Konzentrationen bis zu 10 mg/ml noch keinen Schaden. Hier handelte es sich jedoch um den Versuch, eine reine *Blepharisma*-Kultur zu erhalten. Da das Antibiotikum gezielt zur Elimination von Kontaminanten in die Kultur gegeben wurde, bestätigt sich eben hierdurch, dass Antibiotika in der Umwelt in einem Nahrungsnetz zur Ausschaltung wichtiger Komponenten führen können. So sind auch negative Folgen für die Protisten denkbar. Ein verändertes Zusammenspiel der Mikroflora könnte Effekte zeitigen, die sich dann im gesamten Nahrungsnetz bemerkbar machen. Dies ist in den durchgeführten Versuchen zwar nicht nachweisbar, dennoch bleibt die Frage nach möglichen Effekten von Pharmakarückständen auf Protisten und Bakterien aktuell.

Wenn auch keine Effekte der untersuchten Pharmaka nachgewiesen werden können, so zeigen die Ergebnisse der Positivkontrolle, dass der Versuch prinzipiell geeignet ist, toxische Wirkungen auf Einzeller nachzuweisen. Es zeigte sich, dass *B. japonicum* fähig ist, sich an Schadstoffbelastungen anzupassen und, wenn auch mit deutlich verlangsamter Reproduktionsrate, zu überleben. Ähnliches gilt für *T. thermophila*, auch hier überlebten einige Tiere, die sich dann langsam vermehrten. Der Versuch bildet somit die unmittelbaren Folgen des Eintrages toxischer Substanzen ab. Ebenso kann die Wiederbesiedelung des Systems verfolgt werden. Grundsätzlich ist das System also zur Beurteilung von möglichen Umweltschadstoffen geeignet.

## 4.7 Analyseergebnisse

Die Ergebnisse der Rückstandsanalytik erscheinen weitgehend plausibel. Mit Messwerten zwischen 38,8% und 57,5% der Nominalkonzentration bei Carbamazepin, 81,6% und 120% bei Clofibrinsäure und 66,0% und 86,3% bei Fluoxetin werden Werte erreicht, die sich mit der Literatur decken (MEISENHEIMER & TERNES 2000, LÖFFLER 2003, BROOKS ET AL. 2003B, LÖFFLER ET AL. 2005). Somit ist auch bei der Sedimentextraktion während der Analyse auf Carbamazepin korrekt gearbeitet worden. Die Daten zeigen, dass die aufgetretenen Effekte speziell bei Carbamazepin bei weitaus niedrigeren Werten auftreten, als nach der Nominalkonzentration zu erwarten gewesen wäre. Bezogen auf die analytisch bestimmten Konzentrationen sind die Werte nach dem TGD (ECB, 2003) als umweltrelevant einzustufen. Nicht mehr nachweisbares Carbamazepin könnte mit ausgefrorenem und beim Auftauen der Proben verworfenen Porenwasser verlorengegangen sein. Da die Analyse der an Tag 0 und Tag 28 in Serie I entnommenen Sedimentproben keinen Hinweis auf einen nennenswerten Abbau der Testsubstanz über den Versuchszeitraum zeigte (an Tag 28 waren immer noch zwischen 69% und 109% der gemessenen Startkonzentrationen im Sediment vorhanden), kann davon ausgegangen werden, dass *C. riparius* in dieser und den übrigen Testserien über den kompletten Versuchszeitraum einer weitgehend konstanten Menge Carbamazepin ausgesetzt waren. Im Überstandswasser ergab sich ebenfalls kein Hinweis auf eine Abnahme der Carbamazepinkonzentration während des Versuchs.

Die Konzentrationen von Fluoxetin sind während 72 Stunden praktisch konstant, es findet kein merklicher Abbau statt. Ein kontinuierliches Absinken der Konzentration, wie es bei einer Akkumulation des Fluoxetins durch die Schnecken zu erwarten gewesen wäre, liegt nicht vor. Somit sind die Schnecken über die komplette Versuchsdauer konstanten Fluoxetinkonzentrationen ausgesetzt.

Einzig auffällig ist, dass Ciprofloxacin in keiner der untersuchten Proben nachweisbar war. Drei Gründe sind denkbar: Zum einen waren die eingesetzten Konzentrationen sehr niedrig, so dass trotz Festphasenanreicherung die Bestimmungsgrenzen von 100 ng/ml in wässriger Lösung nicht erreicht wurde. Hinzu kommt, dass Ciprofloxacin stark an Sedimenten und auch an Klärschlämmen adsorbiert (GOLET ET AL. 2003, KÜMMERER 2003). Bei starker Adsorption ist möglicherweise nicht genug Ciprofloxacin verfügbar gewesen, um nachgewiesen werden zu können. Da keine Angaben über geeignete Methoden zur Sedimentextraktion verfügbar waren, wurde die Sedimentprobe im Verhältnis 1:1 mit 1-normaler Salzsäure vermischt und 15 Minuten lang im Ultraschallbad behandelt. Diese Methode erschien nach Vorversuchen geeignet, offensichtlich wurden in diesen Vorversuchen jedoch irreführende Ergebnisse erzielt. Auch waren die eingesetzten Mengen sehr gering, auch mit einer geeigneteren Extraktionsmethode wäre möglicherweise nicht genug Analyt extrahiert worden, um eine sichere Analytik durchzuführen. Aufgrund der Photoinstabilität von Ciprofloxacin (PHILIPPS ET AL. 1990, TIEFENBACHER ET AL. 1994) erscheint auch ein weitgehender Abbau der Substanz binnen 28 Tagen denkbar. Da bereits in den Proben vom Versuchsbeginn kein Ciprofloxacin mehr nachweisbar war, erscheint jedoch eine zu feste Bindung an das Sediment oder schlicht eine zu geringe Aufkonzentrierung der an sich sehr niedrigen Ciprofloxacinmengen wahrscheinlich.

Die Analyse der Rückstände von Clofibrinsäure zeigte, dass praktisch alle ins Sediment eingebrachte Substanz in die Wasserphase überging. Die mit 188% extrem hohe Wiederfindungsrate in der Behandlungsstufe 0,9 mg/kg TG,  $t_{30}$  dürfte auf einen Versuchsfehler zurückzuführen sein. Ein nennenswerter Abbau findet nicht statt.

## 4.8 Mögliche Umweltrisiken

### 4.8.1 Risk Assessment und Relevanz für die Freilandsituation

Zur Bestimmung des Umweltrisikos von Medikamenten sind die Vorgaben der EMEA-Richtlinie (EMA 2005) maßgeblich, die sich in der praktischen Durchführung an den Vorgaben des Technical Guidance Document [TGD] (ECB 2003) orientieren. Demnach ist zur Ermittlung des Umweltrisikos beziehungsweise der Umweltrelevanz eines Xenobiotikums der Quotient aus der Predicted Environmental Concentration (PEC, vorhergesagte Umweltkonzentration) und der Predicted No-Effect-Concentration (PNEC, Konzentration, bei der kein Effekt angenommen wird) zu bilden. Ein PEC/PNEC-Verhältnis  $>1$  bedeutet hiernach, dass die Testsubstanz umweltrelevant ist. Je größer dabei der Quotient, desto höher ist nach dieser Methode die Umweltrelevanz einzustufen. Quotienten von 1 zeigen weiteren Beobachtungsbedarf für die Testsubstanz, bei Ergebnissen  $<1$  ist die Substanz als nicht umweltrelevant einzustufen.

Es ist jeweils die PEC für das beobachtete Umweltkompartiment zu berücksichtigen. Für Carbamazepin ist dies das Sediment. Es wird die von FURLONG (2006, PERSÖNLICHE MITTEILUNG) ermittelte Sedimentkonzentration benutzt, die erst nach Abschluss der experimentellen Arbeiten bekannt wurde. Im Falle von Fluoxetin erwies sich *P. antipodarum* als die sensibelste Testspezies. Da die Effekte bei Exposition über das Wasser auftraten, kann hier als PEC die von KOLPIN ET AL. (2002) gemessene aquatische Umweltkonzentration dienen.

Zur Berechnung der PNEC ist laut TGD bei derartigen Tests die NOEC oder, soweit vorhanden, die  $EC_{10}$  zu benutzen. Um zu gewährleisten, dass bei der Übertragung von Laborergebnissen auf die komplexere Freilandsituation keine Unterschätzung des Risikos erfolgt, ist dieser Wert durch einen Assessment Factor (Sicherheitsfaktor) zu dividieren. Für Fluoxetin ist ein Assessment Factor von 100 zu benutzen. Dieser Wert gilt, wenn Wirkdaten aus chronischen Tests mit einer Trophiestufe und mit Exposition über Wasserphase vorliegen. Für Carbamazepin liegen Wirkdaten aus zwei chronischen Tests mit Sedimentexposition vor. Laut TGD ist hier ein Assessment Factor von 50 zu berücksichtigen.

Für Clofibrinsäure und Ciprofloxacin wird kein Risk Assessment durchgeführt, da keine Effekte im bei den hier durchgeführten Untersuchungen geprüften Konzentrationsbereich auftraten.

Es ergeben sich die in Tabelle 4.1 aufgezeigten PEC/PNEC-Quotienten:

**Tabelle 4.1.** PEC/PNEC-Quotienten der Testsubstanzen

Testsubstanz	PEC	$EC_{10}$	PNEC	Quotient
	CBZ: [ $\mu\text{g/kg}$ ]	[ $\mu\text{g/kg}$ ] (CBZ)	[ $\mu\text{g/kg}$ ] (CBZ)	PEC/PNEC
	FLX: [ $\mu\text{g/l}$ ]	[ $\mu\text{g/l}$ ] (FLX)	[ $\mu\text{g/l}$ ] (FLX)	
Carbamazepin (CBZ)	4,16 (FURLONG 2006, PERS. MITT.)	113	2,26	1,84
Fluoxetin (FLX)	0,012 (KOLPIN ET AL. 2002)	0,81	0,0081	1,48

Für Carbamazepin berechnet sich aus den drei bei 20°C durchgeführten Versuchsreihen eine mittlere  $EC_{10}$  von 113  $\mu\text{g/kg}$  Sediment. Gemäß TGD (ECB, 2003) ist bei Beaufschlagung eines Assessment Factors von 50 hieraus eine PNEC von 2,26  $\mu\text{g/kg}$  abzuleiten. Dieser Wert ist angesichts der von FURLONG (2006, PERSÖNLICHE MITTEILUNG) vorgestellten Daten zum Carbamazepingehalt von Sediment als realistisch anzusehen. Bei Nutzung dieser Kon-



zentration als PEC ergibt sich ein PEC/PNEC-Verhältnis von 1,84. Somit ist Carbamazepin nach EMEA (2005) als potentiell Umweltrisiko zu betrachten.

Die im Versuch mit *Potamopyrgus antipodarum* eingetretenen Effekte erfolgten bei einer analytisch bestimmten Fluoxetinkonzentration von 11 µg/l mit einer EC<sub>10</sub> von 0,81 µg/l. Diese Konzentration ist nach der Auswertungsweise des TGD (ECB 2003) umweltrelevant. Bei Beaufschlagung des Sicherheitsfaktors von 100 ergibt sich eine PNEC 0,0081 µg/l, die damit unterhalb der von KOLPIN ET AL. (2002) gemessenen Umweltkonzentration von 0,012 µg/l liegt. Dies führt zu einem PEC/PNEC-Verhältnis von 1,48, so dass Handlungsbedarf gegeben ist. Die von WESTON ET AL. (2001, zitiert nach BROOKS ET AL 2003B) berechneten Konzentrationen von 0,54 µg/l in Kläranlagenabläufen lassen dort zudem direkte Effekte auf *Potamopyrgus* denkbar erscheinen.

#### 4.8.2 Exposition und Effekte

Die nachstehenden Daten wurden für Carbamazepin, Ciprofloxacin und Clofibrinsäure aus HANISCH ET AL. (2002) entnommen, die Daten für Fluoxetin aus BROOKS ET AL. (2003A).

##### a) Carbamazepin:

- Algentest: EC<sub>50</sub> Wachstumshemmung: 85 mg/l
- Daphnientoxizität: EC<sub>50</sub> Akuttest: 157 mg/l
- Fischtoxizität: LC<sub>50</sub>: 251,9 mg/l

HANISCH ET AL. (2002) stufen Carbamazepin anhand der ihnen vorliegenden Wirkdaten als nicht umweltrelevante Substanz ein. Als niedrigster Wirkwert wird dort die EC<sub>50</sub> für Algentoxizität genannt. Dieser Wert muss anhand der hier ermittelten Ergebnisse stark nach unten korrigiert werden. Wie in Kapitel 4.8.1 ausgeführt, errechnet sich aufgrund der Effektdaten für *C. riparius* eine PNEC von 2,26 µg/kg. FURLONG (2006, PERSÖNLICHE MITTEILUNG) fand Carbamazepin in Flusssedimenten in einer mittleren Konzentration von 4,16 µg/kg, dies ergibt ein PEC/PNEC-Verhältnis von 1,84. Diesen Daten zufolge ist Carbamazepin als umweltrelevante Substanz einzustufen.

Da außer der genannten Studie bislang keine weiteren Sedimentkonzentrationen von Carbamazepin gemessen und publiziert wurden, bedarf diese Einschätzung zunächst weiterer Erhärtung. Notwendig sind weitere Studien über die chronische Toxizität von Carbamazepin. Da sich das Sediment als der wesentliche Expositionsweg erwiesen hat, müssen auch weitere Sedimentkonzentrationen bestimmt werden. Wünschenswert wäre etwa eine Untersuchung der Rheinabschnitte, in denen SACHER ET AL. (1998) mit 2,1 µg/l die bislang höchsten Konzentrationen in Fließgewässern fanden. Gerade solche Sedimente sollten Aufschluss über Bindungsvermögen und Persistenz von Carbamazepin in Flusssystemen geben und somit auch die weitere Beurteilung der Substanz erleichtern.

##### b) Clofibrinsäure

niedrigste Effektdaten, ermittelt für Clofibrat:

- Daphnientest: NOEC Reproduktion: 0,01 mg/l
- Daphnientest: EC<sub>10</sub> Reproduktion: 0,0084 mg/l
- Daphnientest: EC<sub>50</sub> Reproduktion: 0,106 mg/l

weitere Effektdaten:

- Ciliatentest nach PAULI (1996):  $EC_{50}$ : 175 mg/l
- Fischtoxizität:  $EC_{50}$  Sterblichkeit Fischembryonen: 86 mg/l
- Algentoxizität:  $EC_{10}$  Algenwachstum: 5,4 mg/l
- Algentoxizität:  $EC_{50}$  Algenwachstum: 12 mg/l
- Bakterientoxizität:  $EC_{50}$  Lumineszenzhemmung: 100 mg/l

Anhand der als niedrigstem Wirkwert eingesetzten NOEC im Daphnientest gelangen HANISCH ET AL. (2002) zu der Einschätzung, Clofibrinsäure als umweltrelevant einzustufen. Aus dieser NOEC ergibt sich bei Berücksichtigung eines Sicherheitsfaktors von 100 eine PNEC von 0,1 µg/l. TERNES (1998) ermittelte Umweltkonzentrationen zwischen 0,21 µg/l und 0,55 µg/l, FUHRMANN (1999, zitiert nach HANISCH ET AL. 2002) wies in Brandenburger Oberflächengewässern 0,18 µg/l nach. Anhand dieser Daten ergeben sich PEC/PNEC-Quotienten > 1. Anhand der Daten von TIXIER ET AL. (2003), die maximal 0,06 µg/l in Kläranlagenabläufen und 0,03 µg/l im Freiwasser ermittelten, ergeben sich jedoch PEC/PNEC-Quotienten < 1. Chronische Wirkdaten konnten in den hier durchgeführten Experimenten für den berücksichtigten Konzentrationsbereich nicht ermittelt werden. Aufgrund des weitgehenden Verschwindens der Fibrate aus dem Markt ist von sinkenden Umweltkonzentrationen auszugehen. Zu untersuchen wäre jedoch die angesprochene mögliche Wirkung von Clofibrinsäure auf das Schilddrüsenhormonsystem. In diesem Zusammenhang wären auch Bioakkumulationsstudien beispielsweise in Chironomidenlarven oder Lumbriculiden wünschenswert, da eine mögliche Wirkung auf die Schilddrüse bei Vertebraten über die Nahrungskette erfolgen könnte.

Durch die hier ermittelten Daten wird die Beurteilung von Clofibrinsäure als umweltrelevante Substanz nicht unterstützt.

#### c) Ciprofloxacin

- Algentoxizität, Zellvermehrungs-Hemmtest:  $EC_{10}$ : 19,5 mg/l
- Algentoxizität, Zellvermehrungs-Hemmtest:  $EC_{50}$ : 33 mg/l
- Daphnientoxizität:  $EC_{50}$ : 176 mg/l
- Fischtoxizität:  $LC_{50}$  für *Danio rerio*: 1000 mg/l (96 h)
- Bakterientoxizität:  $EC_{10}$ : 0,0018 mg/l
- Bakterientoxizität:  $EC_{50}$ : 0,0093 mg/l

HANISCH ET AL. (2002) geben für Ciprofloxacin eine Umweltkonzentration von 0,22 µg/l an. Aufgrund dieser Konzentration stufen HANISCH ET AL. (2002) Ciprofloxacin als hoch umweltrelevant ein. Maßgebend ist die Bakterientoxizität von 9,3 µg/l, die bei Berücksichtigung eines Sicherheitsfaktors von 100 eine PNEC deutlich unter der PEC ergibt. Dies gilt aufgrund der speziell antibakteriellen Wirkung der Substanz jedoch nur für Bakterien, eine generelle Umweltrelevanz ist hieraus nicht abzuleiten.

Die hier vorliegenden Daten lassen keinen Schluss über die chronische Toxizität zu. Signifikante Effekte konnten für keine der getesteten Arten gefunden werden, der Rückgang der Lumbriculidenzahlen bei einer Nominalkonzentration von 4 µg Ciprofloxacin/kg Sediment kann nach gegenwärtiger Datenlage nicht mit der nötigen Sicherheit als Substanzeffekt erkannt werden. Es ist zwar denkbar, dass der Rückgang der Wurmzahlen in den Behandlungsstufen 2 und 4 µg/kg eine einsetzende negative Fluoxetinwirkung anzeigt. Wäre mit 4 µg/kg bereits die NOEC gegeben, könnte mit einer PNEC von 0,08 (Assessment Factor von 50 nach TGD (ECB 2003)) eine Umweltrelevanz gegeben sein. Solange jedoch keine Sedi-

mentmesswerte für Ciprofloxacin vorliegen, kann eine Beurteilung nicht vorgenommen werden, da Sedimentwirkdaten nicht mit Wasserkonzentrationen verrechnet werden können. Laut KÜMMERER (2003) ist davon auszugehen, dass sich Fluorochinolone in hohem Maß an das Sediment anlagern. Da umweltrelevante Sedimentkonzentrationen von Ciprofloxacin im Rahmen des Möglichen liegen, sind entsprechende Untersuchungen erforderlich, um zu einer weitergehenden Beurteilung zu kommen. Dasselbe gilt für ebenso wie weitere chronische Tests bei höheren Ciprofloxacinkonzentrationen.

d) Fluoxetin

- Algentoxizität: EC<sub>50</sub> Zelldichte: 0,039 mg/l
- Algentoxizität: EC<sub>50</sub> Trübung: 0,024 mg/l
- Daphnientoxizität: LC<sub>50</sub> *Ceratodaphnia dubia*: 0,234 mg/l
- Daphnientoxizität: LC<sub>50</sub> *Daphnia magna* 0,82 mg/l
- Fischtoxizität: LC<sub>50</sub> *Pimephales promelas*: 0,7 mg/l
- LC<sub>50</sub> *Chironomus tentans*: 15,2 mg/kg Sediment

Vor allem nach den im Reproduktionstest mit *P. antipodarum* ermittelten chronischen Wirkdaten ist Fluoxetin als umweltrelevant einzustufen. In dem Versuch wurde eine NOEC von nominal 0,64 µg/l ermittelt. Wie unter 4.8.1 dargelegt, kann von einem PEC/PNEC-Quotienten von 1,48 ausgegangen werden, womit Fluoxetin als umweltrelevant einzustufen ist. Die Daten aus akuten Tests lassen eine solche Beurteilung bemerkenswerterweise nicht zu. Beaufschlagt man einen Sicherheitsfaktor von 1000, wie er nach TGD (ECB 2003) beim Vorliegen von Akutdaten für ein bis drei trophische Ebenen vorgesehen ist, so ist allenfalls für die Algentoxizität mit einer aus der EC<sub>50</sub> ableitbaren PNEC von 0,024 µg/l eine Umweltrelevanz denkbar, allerdings auch nur für unmittelbar in der Umgebung von Kläranlagenabläufen zu erwartende Fluoxetinkonzentrationen (0,54 µg/l, WESTON ET AL. 2001). Für die im Freiwasser vorkommenden Konzentrationen würde nur ein PEC/PNEC-Quotient von 0,5 errechnet.

Aufgrund der hier ermittelten Daten ist jedoch eine verstärkte Überwachung von Fluoxetin geboten. Außerdem zeigen die zahlreichen, von FONG (2001) dargelegten Effekte auf ein breites Spektrum von Taxa ein sehr großes Toxizitätspotenzial an. Auch die Effekte auf Lumbriculiden im hier durchgeführten Reproduktionstest erscheinen vor diesem Hintergrund, obwohl statistisch nicht signifikant, als Indiz für eine mögliche Wirkung von Fluoxetin. Festzuhalten bleibt, dass Fluoxetin ein erhebliches ökotoxikologisches Potential birgt, das durch zahlreiche Studien untermauert wird. Allein aufgrund der hier ermittelten Daten ist von einer Umweltrelevanz auszugehen. Wie unter 4.5.4 bis 4.6 beschrieben, liegen zahlreiche Berichte über Effekte in weiteren Taxa und auf mehrere verschiedene Organe und physiologische Prozesse vor. Es ist anzunehmen, dass Untersuchungen an weiteren Taxa weitere ökotoxikologisch relevante Effekte aufzeigen. Vor diesem Hintergrund ist es dringend erforderlich, den weiteren Eintrag von Fluoxetin in die aquatische Umwelt so weit wie möglich zu unterbinden.

### 4.8.3 Persistenz der untersuchten Substanzen

#### - Carbamazepin

SCHARF ET AL. (2004) fanden bei Untersuchungen an der Donau weder in den Schwebstoffen des Wassers noch im Sediment Carbamazepin. Die einzige bisherige Bestimmung im Sediment erfolgte durch FURLONG (2006, PERSÖNLICHE MITTEILUNG). Da in großen Flüssen wie der Donau erhebliche Carbamazepinfrachten vorkommen, wäre gerade hier eine Sedimentbindung zu erwarten. Angesichts dieser Befunde und der Tatsache, dass Carbamazepin mittlerweile auch im Trinkwasser nachgewiesen wurde, erfolgt eine solche Bindung offensichtlich nicht. Laut LÖFFLER ET AL. (2005) ist sie nicht anzunehmen. Gleichwohl bestätigt die in seinen Arbeiten ermittelte Halbwertszeit von >365 Tagen die Persistenz von Carbamazepin. Angesichts der Nachweise in Trinkwasser (TERNES 2001) und sogar in marinen Systemen (WEIGEL ET AL. 2001) ist Carbamazepin augenfällig stark persistent. Laut LÖFFLER ET AL. (2005) verteilt sich das in einem Ökosystem vorhandene Carbamazepin zu etwa gleichen Teilen in Sediment und Wasser. Der im Wasser verbleibende Anteil wird so offensichtlich in die Meere eingetragen, während der im Sediment befindliche Anteil weiter in das Grundwasser wandern und so ins Trinkwasser gelangen könnte. Bisher unerforscht ist die Bioakkumulation in aquatischen Organismen. Entsprechende Untersuchungen in belasteten Flüssen wären somit erforderlich.

Nach den vorliegenden Daten ist nicht von einer Anreicherung von Carbamazepin im Sediment auszugehen. Gleichwohl erscheint die Substanz jedoch stark persistent, so dass ihr ökotoxikologisches Potential weiterer Untersuchungen bedarf.

#### - Clofibrinsäure

Genau wie Carbamazepin wurde auch Clofibrinsäure im Trinkwasser nachgewiesen. LÖFFLER ET AL. (2005) fanden in einem Sediment/Wasser-Testsystem bei einer Versuchsdauer von 100 Tagen noch 55% der eingesetzten Clofibrinsäure. Die Halbwertszeit wird dort mit 119 Tagen angegeben. Eine Sorption an das Sediment fand nur zu maximal 12% statt. Auch in den hier durchgeführten Versuchen konnte fast die gesamte eingesetzte Clofibrinsäure-Masse in der Wasserphase nachgewiesen werden.

Die fortbestehende Präsenz von Clofibrinsäure im aquatischen System trotz des rückläufigen Fibrateinsatzes, ihre Persistenz und die weite Verbreitung in Oberflächen-, Grund-, Trink- und Meerwasser (TIXIER ET AL. 2003, BUSER & MÜLLER 1998, STAN ET AL. 1994) lässt eine weitere Überwachung der Substanz geboten erscheinen. Da kaum Adsorption an das Sediment oder an weitere Erdpartikel erfolgt, bleibt gelöste Clofibrinsäure auf lange Zeit in der Umwelt erhalten. Bei Kontakt grundwasserführender Bereiche mit Oberflächenwasser ist eine Migration des Pharmakons von einem Kompartiment in das andere möglich. Durch Uferfiltration im Zuge der Abwasseraufbereitung und Trinkwassergewinnung werden auch tiefere Grundwasserschichten und, wie von STAN ET AL. (1994) beschrieben, auch das Trinkwasser erreicht.

Angesichts der Tatsache, dass sich Clofibrinsäure und das wesentlich persistentere Carbamazepin in ihrer Wirkung verstärken (CLEUVERS 2003), ist eine Beobachtung von Clofibrinsäure weiterhin geboten. Gerade die letztgenannte Arbeit zeigt, dass die Mischtoxizität mehrerer Substanzen größere Probleme als einzelne Toxizitäten darstellen kann. Weitere Beobachtung, auch Bioakkumulationsstudien zu diesem Pharmakon, erscheinen erforderlich.

Hartsubstratbewohner wie *P. antipodarum* können bei Exposition über die Wasserphase Clofibrinsäure akkumulieren, auch filtrierende Mollusken oder Daphnien könnten betroffen sein. Aufmerksamkeit gebieten auch die Nachweise im Trinkwasser. STAN ET AL. (1994) wiesen in Berliner Trinkwasserproben zwischen 7 und 165 ng/l nach. Solange Clofibrinsäure Bestandteil der allgemeinen Medikamentenfracht in Oberflächengewässern und Trinkwasser ist, ist ihre Beobachtung geboten.

- Ciprofloxacin

Laut KÜMMERER (2003) binden Chinolone stark an das Sediment und an Klärschlamm und werden dort auch nicht abgebaut. Zwar ist Ciprofloxacin in hohem Maße lichtempfindlich (PHILIPPS ET AL. 1990, TIEFENBACHER ET AL. 1994), doch findet im Sediment nur ein geringer Abbau statt (KÜMMERER 2003); offensichtlich wirkt die Bindung an das Sediment photostabilisierend. Obwohl die gemessenen Umweltkonzentrationen relativ gering sind (CALAMARI ET AL. 2003), ist doch von einem hohen Persistenzpotenzial auszugehen, zumal stellenweise auch höhere Konzentrationen gemessen werden (HANISCH ET AL. 2002).

Vor allem für sedimentbewohnende Organismen kann Ciprofloxacin also Risiken bedeuten. Wenn auch für *L. variegatus* keine signifikanten Effekte nachgewiesen werden konnten, so ist zumindestens eine regelmäßige Beprobung der Sedimente von ciprofloxacinbelasteten Flüssen geboten, um tatsächliche Informationen über die Persistenz von Ciprofloxacin zu gewinnen, die nach aktueller Datenlage groß zu sein scheint. In Verbindung mit der Bakterientoxizität von Ciprofloxacin (HANISCH ET AL. 2002, HARTMANN ET AL. 1999) gibt eine Sedimentbelastung Anlass zu Bedenken, zumindest in Bereichen von Kläranlagenabläufen. Bei einer Anreicherung von Ciprofloxacin im Sediment sind ab einer gewissen Konzentration dann auch Effekte auf dort vorkommenden Bakterien denkbar. LIMA ET AL. (1995) zeigen am Beispiel von *Shigella* die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen weit über Krankenhäuser hinaus. Da hierbei auch Artgrenzen keine Rolle spielen (WITTE 2000), ist eine weitere Beobachtung der Ciprofloxacinfracht sowie die Suche nach Umwelteffekten geboten.

- Fluoxetin

Über die Persistenz von Fluoxetin liegen bislang keine Daten vor. BROOKS ET AL. (2003B) nennen jedoch einen BCF von 2,0 bei neutralem pH, so dass von einer Anreicherung in aquatischen Organismen auszugehen ist. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sediment- und Wasseranalysen zeigen außerdem, dass sich der größte Teil des eingesetzten Fluoxetins nach 30 Tagen im Sediment wiederfindet. Zwar wurde hier das Sediment belastet, doch zeigt das Beispiel der ebenfalls untersuchten Clofibrinsäure, dass nach der gleichen Versuchszeit die Substanz zu 81,6% bis 120% im Wasser nachweisbar war. Die Zeit würde also ausreichen, um die Umverteilung der Testsubstanz zu ermöglichen. Angesichts dieser Daten ist von einer Anreicherung von Fluoxetin im Sediment und aquatischen Organismen auszugehen. Fluoxetin ist damit als persistente Umweltchemikalie zu betrachten.

#### 4.8.4 Ökologische Relevanz, mögliche Konsequenzen, Möglichkeiten zur Vermeidung von Medikamentenemissionen

Grundsätzlich ist die Frage zu stellen, inwieweit sich die Ergebnisse aus Laborversuchen in das Freiland übertragen lassen. Die Berechnung anhand der Vorgaben des TGD (ECB 2003)

basieren nicht auf direkten Messungen, sondern stellen Empfehlungen dar, um die Unterschätzung von möglichen Risiken zu vermeiden. Direkte Vergleiche zwischen Modellsystemen und der Freilandsituation gestalten sich aufgrund der Komplexität letzterer grundsätzlich schwierig. FÖRSTER ET AL. (2004) zeigten in einer vergleichenden Streuabbaustudie zwischen terrestrischen Modellökosystemen und dem Freiland, dass die Laborsysteme tendenziell unempfindlicher reagierten. Grund hierfür war, dass die Modellökosysteme unter konstanten Klimabedingungen gehalten wurden, während im Freiland eine wechselhafte Temperatur- und Feuchtigkeitssituation gegeben war. Ein Zusammenwirken von Schadstoffstress und ungünstigen Umweltbedingungen könnte also die Schadstoffwirkung potenzieren. Zu ähnlichen Resultaten gelangen BRAKEFIELD & MAZZOTTA (1995) in ihrer Studie über die Entwicklung von *Bicyclus anynana* im Labor und im Freiland. Die Carbamazepin-Versuchsserie IV, die unter erhöhten Temperaturen durchgeführt wurde, zeigte eine geringere Fruchtbarkeit der Mücken, zusätzlich zur ohnehin reduzierten Emergenz. Konkret zeigt dies, dass sich in heißen Sommern der durch Carbamazepin ausgelöste Stress noch verstärken kann. Die hier vorliegenden Daten bestätigen also die Herangehensweise des TGD, durch die Implikation von Assessment Factors die PNEC herabzusetzen. Zudem zeigt sich im *Potamopyrgus*-Versuch mit Fluoxetin, dass bei örtlich erhöhten Konzentrationen bereits ohne diese Implikation ein Schadstoffniveau gegeben sein kann, das eine beginnende Gefährdung anzeigt.

Bei geeigneter Wahl der Laborbedingungen kann davon ausgegangen werden, dass Laborergebnisse die Freilandsituation – unter Berücksichtigung von Sicherheitsschwellen – wiedergeben können. Dies ergibt sich etwa aus den Arbeiten von BAT & RAFFAELI (1998) und LENIHAN ET AL. (1995) sowie CULP ET AL. (2000).

Vor diesem Hintergrund ist eine konservative Bewertung von Pharmaka in der Umwelt grundsätzlich zu befürworten.

Hinzu kommen starke Schwankungen der Einträge von Medikamenten in Kläranlagen (TERNES 1998). Gerade bei so hochaktiven Wirkstoffen wie Fluoxetin stellt sich die Frage, ob eine in regelmäßigen Abständen auftretende erhöhte Belastung nicht genauso verhängnisvoll sein kann wie eine permanente, niedrige. Auch dies indiziert eine konservative Bewertung. Wie das Beispiel Fluoxetin zeigt, sind Pharmaka auch in geringen Konzentrationen hochaktiv, außerdem können sie in Nicht-Zielorganismen, wie der aquatischen Fauna, verschiedene, unspezifische Effekte auslösen (FONG 2001). Ein weiteres Beispiel hierfür ist der Verzehr von Diclofenac-belasteten Rinderkadavern durch Geier, die daraufhin an Eingeweidegicht erkrankten (OAKS ET AL. 2004).

Vor diesem Hintergrund sind Beurteilungen von Pharmaka als umweltrelevant nach TGD zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht als Überschätzung zu sehen. Die spärliche Datenlage lässt eine endgültige Beurteilung nicht zu, allein deshalb sind Hinweise auf Schadeffekte ernstzunehmen. Die entsprechenden Richtlinien der EU (EMA 2005) sehen außerdem Überprüfungen von Medikamenten in der Umwelt generell vor, sobald eine PEC >0,1 µg/l gemessen oder zu erwarten ist. Für Carbamazepin und Clofibrinsäure werden kontinuierlich höhere Werte gemessen (TERNES 1998, BUSER & MÜLLER 1998, AHRER ET AL. 2001, TIXIER ET AL. 2003, BOYD ET AL. 2003). Für Fluoxetin liegen in Europa bislang keine Messdaten vor. Nach folgender Formel (EMA 2005) kann für die Bundesrepublik Deutschland eine PEC berechnet werden:

$$PEC = \frac{A \cdot (100 - R)}{365 \cdot P \cdot V \cdot D \cdot 100}$$

- A = Fluoxetinverbrauch (kg/Jahr)  
 R = Metabolisierung der Testsubstanz  
 P = Einwohnerzahl in Deutschland  
 V = Abwasservolumen/Tag und Einwohner  
 D = Verdünnungsfaktor: 1 ohne Verdünnung, 10 mit Verdünnung  
 bei Einleitung des Abwassers in Oberflächengewässer  
 100 = Umrechnungsfaktor

Für 2002 wurde eine Bevölkerungszahl von 82,5 Mio. in Deutschland ermittelt, außerdem eine Abwassermenge von 127 l täglich pro Einwohner (für 2001, Angaben nach STATISTISCHES BUNDESAMT 2005) Fluoxetin wurde in einer Menge von 18,2 Mio. Tagesdosen (20 mg Fluoxetin) im Jahr 2002 verschrieben (SCHWABE & PAFFRATH 2004), was einer Gesamtmasse von 364 kg Fluoxetin entspricht. Folgender PEC-Wert ergibt sich, wenn angenommen wird, dass keine Metabolisierung der Substanz erfolgt (Wert von 0 für R) und bei einer Einleitung fluoxetinhaltiger Abwässer keine Verdünnung stattfindet (Wert von 1 für D):

$$PEC = \frac{364 \text{ kg} \cdot (100 - 0)}{365 \text{ Tage} \cdot 82,5 \text{ Mio.} \cdot 127 \text{ l} \cdot 1 \cdot 100} = 0,0952 \text{ } \mu\text{g/l}$$

Hieraus ergibt sich folgendes, theoretisches PEC/PNEC-Verhältnis:

$$\frac{PEC}{PNEC} = \frac{0,0952 \text{ } \mu\text{g/l}}{0,0081 \text{ } \mu\text{g/l}} = 11,8$$

Bei Annahme einer zehnfachen Verdünnung der Fluoxetinkonzentration im Oberflächenwasser liegt der Quotient noch bei 1,18, auch hier ist die Substanz noch als umweltrelevant zu beurteilen.

Für Großbritannien zeigen SEBASTINE & WAKEMAN (2003), dass auch hier eine Fluoxetin-PEC >0,01  $\mu\text{g/l}$  und somit gemäß der EMEA-Richtlinie (EMEA 2005) Untersuchungsbedarf gegeben ist. Die Messungen von KOLPIN ET AL. (2002) wiesen in den USA, wo Fluoxetin in sehr hohem Maße verschrieben wird (1,2 Billionen Tabletten in 2003, FDA 2003), eine zwar geringere Konzentration aus, doch auch bei dieser Konzentration zeigte sich ein Wert, der Umweltrelevanz belegte. Sowohl nach theoretischer Berechnung als auch nach gemessenen Konzentrationen ist Fluoxetin somit als umweltrelevant zu beurteilen.

Für Ciprofloxacin kann kein PEC/PNEC-Verhältnis aus chronischen Daten berechnet werden. Bei Berechnung desselben anhand akuter Toxizitätsdaten ergibt sich auch hier Umweltrelevanz. Vor dem Hintergrund wachsender Besorgnis über Antibiotikaresistenzen (LIMA ET AL. 1995, HOUSE OF LORDS 1998) ist diese Einstufung sinnvoll.

Zur Berechnung von PEC/PNEC-Quotienten können für die vier Testsubstanzen nach folgender Formel (ECB 2003) die in Tabelle 4.2 genannten PEC-Werte für das Sediment berechnet werden:

$$PEC_{\text{sed}} = \frac{K_{\text{susp-water}}}{\text{RHO}_{\text{susp}}} * PEC_{\text{water}} * 1000$$

Hierbei sind:

$PEC_{\text{water}}$ : in Wasser gemessene Umweltkonzentrationen für die jeweilige Substanz

$PEC_{\text{sed}}$ : berechnete Sedimentkonzentration

$RHO_{\text{susp}}$ : Dichte der Schwebstoffe

$K_{\text{susp-water}}$ : Verteilungskoeffizient Schwebstoff/Wasser

$RHO_{\text{susp}}$  wird nach folgender Formel berechnet:

$$RHO_{\text{susp}} = F_{\text{solid}_{\text{susp}}} * RHO_{\text{solid}} + F_{\text{water}_{\text{susp}}} * RHO_{\text{water}} + F_{\text{air}_{\text{susp}}} * RHO_{\text{air}}$$

Es sind hier:

$F_{x_{\text{susp}}}$ : Anteil der Phase x im Kompartiment Schwebstoff

$RHO_x$ : Dichte der Phase x

$RHO_{\text{susp}}$ : Dichte des Gesamtkompartiments Schwebstoff

Die entsprechenden Werte für  $F_x$  und  $RHO_x$  wurden aus dem TGD (ECB 2003) entnommen.

$K_{\text{susp-water}}$  berechnet sich wie folgt:

$$K_{\text{susp-water}} = F_{\text{air}_{\text{susp}}} * K_{\text{air-water}} + F_{\text{water}_{\text{susp}}} + F_{\text{solid}_{\text{susp}}} * \frac{K_{p_{\text{susp}}}}{1000} * RHO_{\text{solid}}$$

Es sind

$F_{\text{air}}$ : Anteil Luft im Kompartiment Schwebstoffe

$F_{\text{water}}$ : Anteil Wasser im Kompartiment Schwebstoffe

$F_{\text{solid}}$ : Anteil Feststoff im Kompartiment Schwebstoffe

$RHO_{\text{solid}}$ : Dichte der Feststoffphase

$K_{p_{\text{susp}}}$ : Verteilungskoeffizient Feststoff/Wasser im Kompartiment Schwebstoff

$K_{\text{air-water}}$ : Verteilungskoeffizient Luft/Wasser

$RHO_{\text{solid}}$  ist per definitionem = 2500,  $F_{\text{air}}$ ,  $F_{\text{water}}$  und  $F_{\text{solid}}$  werden aus ECB (2003) entnommen.

$K_{\text{air-water}}$  berechnet sich wie folgt:

$$K_{\text{air-water}} = \frac{\text{HENRY}}{R * \text{Temp}} \text{ mit}$$

HENRY: Henry-Konstante der jeweiligen Substanz

R: ideale Gaskonstante

Temp: Temperatur im Grenzbereich Luft/Wasser

$K_{p_{\text{susp}}}$  errechnet sich folgender Gleichung:



$$K_{p_{\text{susp}}} = F_{\text{oc}_{\text{susp}}} * K_{\text{oc}}$$

Es sind hier:

$F_{\text{OC}_{\text{susp}}}$  : Anteil des organischen Kohlenstoffs im Kompartiment Schwebstoff

$K_{\text{OC}}$ : Verteilungskoeffizient Organischer Kohlenstoff/Wasser.

$F_{\text{OC}_{\text{susp}}}$  wird aus ECB (2003) entnommen,  $K_{\text{OC}}$  für die jeweilige Substanz aus der Literatur.

Schlussendlich berechnen sich für die getesteten Pharmaka folgende  $\text{PEC}_{\text{sed}}$ -Werte (Tabelle 4.2):

**Tabelle 4.2.** Wahrscheinliche Sedimentkonzentrationen ( $\text{PEC}_{\text{sed}}$ ) der untersuchten Pharmaka

Substanz	$\text{PEC}_{\text{Wasser}}$ ( $\mu\text{g/l}$ )	$K_{\text{OC}}$ (l/kg)	( $\text{PEC}_{\text{sed}}$ ) ( $\mu\text{g/kg}$ )
Carbamazepin	2,10	83 LÖFFLER ET AL. (2005)	5,43
Clofibrinsäure	0,55	26 LÖFFLER ET AL. (2005)	0,74
Ciprofloxacin	0,026	13900 CARDOZA ET AL. (2004)	7,88
Fluoxetin	0,012	9,33 BROOKS ET AL. (2003B)	0,012

Die für Carbamazepin berechnete  $\text{PEC}_{\text{sed}}$  unterscheidet sich nur wenig von der von FURLONG (2006, PERSÖNLICHE MITTEILUNG) gemessenen Sedimentkonzentration, dieser gemessene Wert stützt die Ergebnisse der Berechnung. Die in dieser Arbeit erhobenen chronischen Effektdaten deuten daher auf generelle Umweltrelevanz von Carbamazepin hin, da bei Carbamazepinbelastung von Oberflächengewässern überall vergleichbare Sedimentkonzentrationen zu erwarten sind. Für Clofibrinsäure wurden keine substanzbezogenen Effekte ermittelt. Auch aus der hier berechneten  $\text{PEC}_{\text{sed}}$  ergibt sich somit keine Umweltrelevanz.

Fluoxetin würde sich in einer der  $\text{PEC}_{\text{Wasser}}$  entsprechenden Konzentration ans Sediment anlagern. Diese PEC liegt jedoch weit unterhalb der von BROOKS ET AL (2003A) genannten  $\text{LC}_{50}$  von 15,2 mg/kg. Umweltrelevanz ist somit nur anhand der im Wasser gemessenen Werte abzuleiten, da die in dieser Arbeit festgestellten Effekte ausschließlich an der wasserexponierten *P. antipodarum* festgestellt wurden. Die hier getroffene Einstufung ist dabei noch das Ergebnis einer eher konservativen Berechnung, da mit den von METCALFE ET AL. (2003) im Little River (Ontario, Canada) 0.099  $\mu\text{g/l}$  auch höhere Fluoxetinkonzentrationen bekannt sind als die, mit der hier das PEC/PNEC-Verhältnis ermittelt wurde.

Für Ciprofloxacin ergibt sich eine  $\text{PEC}_{\text{sed}}$ , die höher als die hier verwendete Maximalkonzentration ist. Angesichts der Berichte zum Sorptionsverhalten von Ciprofloxacin (GOLET ET AL. 2003) erscheint sie realistisch. Erneute Versuche mit höheren Konzentrationen sind daher nötig, auch, um festzustellen, ob es bei höheren Konzentrationen um 7  $\mu\text{g/kg}$  zu gegenüber der Kontrolle signifikanten Reduzierungen der Wurmzahlen kommt.

Angesichts der hohen Persistenz und des teilweise hohen Anlagerungspotentials von Medikamenten in die Sedimente (LÖFFLER ET AL. 2005, GOLET ET AL. 2003) ist zu überlegen, wie der weitere Eintrag von Medikamenten in die Umwelt unterbunden werden kann. Ein Verschwinden aus dem Markt ist lediglich bei Fibraten zu erwarten, da deren therapeutischer Nutzen zunehmend als ungenügend beurteilt wird (INSTITUT FÜR DIE

ARZNEIMITTELVERORDNUNG IN DER GESETZLICHEN KRANKENVERSICHERUNG 2002). Selbst dann ist allerdings noch über lange Zeit mit einer Clofibrinsäurebelastung der Gewässer zu rechnen, da die Persistenzzeit der Substanz auf 21 Jahre geschätzt wird (ZUCCATO ET AL. 2000). Sie erwies sich in Abbauprüfungen als weitgehend resistent gegen Biodegradation (ZWIENER & FRIMMEL 2000).

Die übrigen Wirkstoffe sind, wenn auch mit teilweisen Einschränkungen, in Gebrauch und werden auf absehbare Zeit weiter verschrieben und in die Umwelt eingetragen. Angesichts des unverändert bestehenden therapeutischen Nutzens kann ein Verbot dieser Mittel aus Umweltschutzgründen nicht in Betracht kommen. Konsequenzen können daher realistischerweise nur in einer Eintragsminderung durch veränderte Abwasserbehandlung bzw. getrennte Entsorgung von Haushalts- und Klinikfäkalien bestehen. Einzig für Fluoxetin wären auch striktere Kontrollen der Verordnungspraxis denkbar, da die Substanz oft unsachgemäß verordnet wird (OLFSON 1998), doch dürfte dies schwierig praktisch umzusetzen sein.

Ebenso denkbar wäre ein Einsatz von auf die Biodegradation pharmazeutischer Wirkstoffe optimierter Bakterienstämme. Fraglich bliebe, inwieweit hierdurch eine Gefahr von Resistenz gegen diese Wirkstoffe in der klinischen Anwendung erwüchse.

Zur Verminderung des Eintrages erscheint außerdem eine weitestmögliche Separierung des Urins von den sonstigen Haushaltsabwässern geboten. Laut SIEGERIST (2003) stellen Separationstoiletten eine Möglichkeit hierzu dar. Bei Trocknung des Urins mit geeigneten, ökologisch unbedenklichen Bindemitteln und Verbrennung bei hohen Temperaturen wäre eine Spaltung von Pharmakarückständen gesichert. Angesichts des großen Aufwandes, solche Verfahren flächendeckend einzuführen, liegt eine Alternative in dem von WENNMALM (2003) vorgestellten Programm einer ökologischen Zertifizierung von Medikamenten und einer weitestmöglich an den Umwelteigenschaften der Wirkstoffe orientierte Verschreibungspraxis.

Kurz- und mittelfristig ist über Verschreibungspraxis und verbesserte Abwasserreinigung eine Minderung der Gewässerbelastung mit Pharmaka möglich, langfristig sollte dies durch verbesserte Fäkalienentsorgung unterstützt werden.

#### 4.8.5 Arzneimittelrückstände als Umweltrisiko unter Berücksichtigung der ermittelten Daten

Bislang liegen nur wenige Daten über die Umwelteffekte von Pharmakarückständen vor. Bisherige Untersuchungen ergeben für die Pharmaka ein unterschiedliches Bild. HANISCH ET AL. (2002) stufen Clofibrinsäure und Ciprofloxacin als umweltrelevant ein, die Beurteilung gründet sich auf der Toxizität gegenüber Bakterien und Daphnien. Für Clofibrinsäure kommen FERRARI ET AL. (2004) zu einem abweichenden Ergebnis, hier wird mit einem PEC/PNEC-Quotienten von 0,078 für chronische Daten keine Umweltrelevanz erkannt. Testorganismen waren hierbei *Brachionus calyciflorus* und *Synechococcus leopoldensis*. Die Autoren räumen generell chronischen Tests den Vorrang vor akuten ein, da chronische Tests mit höherer Empfindlichkeit reagieren. Aus der zitierten Studie ergibt sich ferner die Notwendigkeit zur intensiveren Beprobung von Oberflächengewässern, da eine reine Berechnung der PEC häufig gegenüber den tatsächlich gemessenen Konzentrationen zu Überschätzungen führt. Nichtsdestoweniger zeigen die vorliegenden Daten, dass auch bei gemessenen Umweltkonzentrationen (Measured Environmental Concentrations, MECs) Umweltrelevanz angezeigt ist. Die eigenen Experimente wurden bei Pharmakakonzentrationen

weit unterhalb des für Akuttests üblichen Rahmens durchgeführt. Somit empfiehlt es sich, für die künftige Beurteilung von Pharmaka in der Umwelt komplexere Testsysteme einzusetzen.

Ein weiterer Punkt, der bei der Beurteilung von Pharmakarückständen häufig außer Acht gelassen wird, ist die Wirkung von Substanzgemischen, obwohl in Oberflächengewässer zahlreiche Rückstände als Substanzgemisch vorkommen. CLEUVERS (2003) berichtet über eine vielfach höhere Mischtoxizität von Carbamazepin und Clofibrinsäure im Daphnientest, wohingegen die Einzelsubstanzen in diesem Test kaum Wirkung zeigen. Auch RICHARDS ET AL. (2004) fanden teilweise drastische Effekte in einer Mikrokosmosstudie mit Fischen (*Lepomis gibbosus*), Phyto- und Zooplankton sowie Wasserpflanzen. Getestet wurde ein Gemisch aus Ibuprofen, Fluoxetin und Ciprofloxacin. Bereits bei einer Fluoxetinkonzentration von 100 µg/l trat eine dramatisch erhöhte Fischmortalität ein, auch die Abundanz und Diversität von Phyto- und Zooplankton war deutlich beeinträchtigt. Im Zusammenhang hiermit steht eine Studie von FORAN ET AL. (2004), die bei noch deutlich niedrigeren Fluoxetinkonzentrationen bereits Anzeichen für Entwicklungsstörungen bei *Oryzias latipes* fand.

Zum einen zeigen diese Beispiele, dass die gängigen Testmethoden, wie etwa die Einzeltestung von Organismen der aquatischen Trias (Algen, Daphnien, Fische), nicht immer ausreichen, um die tatsächliche Gefährdung durch Pharmakarückstände in der Umwelt zu erfassen. Zum anderen ist nicht immer nur die direkte Toxizität von Bedeutung, sondern es sind weitere Parameter wie die Reproduktion und Missbildungen in kommenden Generationen zu erfassen. Gerade der Reproduktionstest mit Fluoxetin und *P. antipodarum* zeigt, dass zwar auch direkte Toxizitäten gegeben sind, jedoch bereits viel früher Effekte eintreten, die zwar nicht das Individuum, aber die Population als solche betreffen. Die übliche Weise der Biotestung von Pharmakarückständen erscheint vor diesem Hintergrund als unzureichend, um die gesamte Bandbreite von Pharmakarückständen zu erfassen. Reproduktionstests über mehrere Wochen, die Nutzung komplexerer Systeme und die Berücksichtigung von Mischtoxizitäten sind erforderlich. In diesem Zusammenhang sind auch Sedimentbiotests nötig, da verschiedene Pharmaka das Potenzial besitzen, sich im Sediment anzureichern (ZUCCATO ET AL. 2000).

Besonders Rückstände von Antibiotika sind zu überwachen. Die Arbeit von HARTMANN ET AL. (1999) zeigt erste Effekte von Ciprofloxacin auf das Genom von Bakterien bereits bei Konzentrationen von 5,2 µg/l, und damit bei deutlich geringeren als den von HANISCH ET AL. (2002) genannten Konzentrationen. Unter Berücksichtigung der Sicherheitsfaktoren nach TGD (ECB 2000) ist Ciprofloxacin nach dieser Studie als umweltrelevant einzustufen.

Verschiedene Studien zeigen, dass sich Antibiotikaresistenzen schnell und weit ausbreiten können. Die bereits erwähnte Arbeit von LIMA ET AL. (1995) zeigt die Verbreitung von Resistenzen gegen fünf Antibiotika nicht nur im Einzugsbereich zweier Krankenhäuser, sondern durch die gesamte betroffene Kommune. McDERMOTT ET AL. (2002) weisen auf einen Anstieg der Resistenz von *Campylobacter jejuni* gegen Ciprofloxacin hin, der mit der Zulassung von Ciprofloxacin in der Geflügelzucht einhergeht. Dies ist nicht zuletzt ein weiterer Beleg für die bedenkliche Praxis der Nutzung von Humanpharmaka in der Tierzucht, sondern es wird auch deutlich, dass es – speziell bei Antibiotika – nicht genügt, als Maß für eine Umweltrelevanz nur die direkte Toxizität zu erfassen. Nach WITTE (2000) verbreiteten sich Antibiotikaresistenzen über die Artgrenzen von Bakterien hinweg. Gerade für Fluorochinolone, die zu den Reserveantibiotika zählen, wäre eine Resistenzausbreitung fatal.

#### 4.8.6 Ausblick

##### 4.8.6.1 Verbesserung der angewandten Methoden

###### - Destruentenmikrokosmos

Der Destruentenmikrokosmos konnte in diesem Projekt nicht als sicheres Testverfahren etabliert werden. Hauptgrund war das unerwünschte Wachstum von Pilzen in den Ansätzen. Hierdurch wurde es erforderlich, beim Resuspendieren der abzentrifugierten *Tetrahymena* ein erneutes Suspendieren der mit herauspipettierten Pilze zu vermeiden. Dies gelang zwar weitgehend, da sie nicht resuspendierten, doch konnten Verunreinigungen in der untersuchten Probe und somit falsche Extinktionswerte nie ausgeschlossen werden.

Ursächlich für die eintretenden Verpilzungen war, dass *Blepharisma* nicht in einem vollsynthetischen Medium und somit auch nicht keimfrei gehalten werden konnten, im Gegensatz zu *Tetrahymena*, deren Pepton-Medium ausschließlich aus Laborsubstanzen gemischt und anschließend sterilisiert wurde. Für *Blepharisma* steht ein solches Medium nicht zur Verfügung, zumal sämtliche Anbieter von *Blepharisma* diese in unsteriler Kultur hielten. Ein Einsatz von Antibiotika, wie von MARTI ET AL. (1979) vorgestellt, kam nicht in Frage, da eben die Effekte von Pharmaka zur Untersuchung standen. Sensibilisierte Versuchsorganismen hätten zumindestens für die Untersuchungen mit Ciprofloxacin keine verlässlichen Daten mehr geliefert.

SMITH & GIESE (1967) konnten in umfangreichen Versuchen kein Medium finden, das völlig ohne die Zugabe von nicht definierten Bestandteilen wie getrocknetem Salat auskam. Auch DIEHL & FEISSEL (2001) verwendeten ein Medium mit Pellets aus Protozoen. Zum einen waren diese Bestandteile im Rahmen dieser Arbeit nicht zu beschaffen, zum zweiten zeigen diese Arbeiten, dass ein bakterienfreies Medium nur begrenzt für *Blepharisma* geeignet ist.

Hauptsächlich ist also das Medium für den Destruentenmikrokosmos zu verbessern, etwa durch die definierte Zugabe von Bakterien zu einem ansonsten sterilen Medium. Weiterhin sind geeignete Zellkulturschränke zu benutzen, die nicht zur Verfügung standen, um völlige Keimfreiheit zu gewährleisten. Die benutzten Wärmeschränke ließen offensichtlich Verkeimungen der Ansätze aufkommen.

###### - Reproduktionstest mit *Lumbriculus variegatus*

Das in den Versuchen mit *L. variegatus* benutzte Sediment bedarf ebenfalls der Verbesserung, da die niedrigen Reproduktionsraten zum Teil möglicherweise auch auf die verwendeten Kohlenstoffquellen zurückgehen.

Nach Abschluss der eigenen Laborarbeiten zeigte sich, dass nach Einsatz von autoklaviertem Brennesselpulver im Sediment bessere Reproduktionsraten erreicht wurden (SCHMITT 2004, PERS. MITTEILUNG). Hiervon war zunächst abgesehen worden, da nicht bekannt war, inwieweit das Erhitzen die Brennessel verändern würde. Es ist anzunehmen, dass durch Brennesselzugabe in das Sediment das Problem der geringeren Reproduktionsraten behoben werden kann. Zu überprüfen ist auch, ob die Verwendung eines Sediments nach EGELER ET AL. (2005) mit Zusatz von Brennessel und Kaolin veränderte Ergebnisse gegenüber den hier vorliegenden Daten brächte.

#### 4.8.6.2 Weitere Forschung zu Pharmaka in der Umwelt und speziell an den untersuchten Substanzen

- Allgemeiner Forschungsbedarf

Sämtliche Arbeiten zu Pharmaka in der Umwelt zeigen ein nach TGD bestimmtes Risikopotential für Pharmaka auf (z. B. HANISCH ET AL. 2002, BROOKS ET AL. 2003A). Für die meisten in Oberflächengewässern vorkommenden Pharmakarückstände liegen jedoch nur aus Akuttests gewonnene Wirkdaten vor, Reproduktions- oder Lebenszyklusdaten sind selten (NENTWIG ET AL. 2004, NENTWIG ET AL. 2005, OETKEN ET AL. 2005). Eine wesentliche Aufgabe in der Forschung zu Arzneimittelnrückständen besteht somit darin, Erkenntnisse über die chronischen Effekte von Pharmakarückständen zu gewinnen. Außerdem sollten verstärkt Umweltproben untersucht werden beziehungsweise Versuchsorganismen in belasteten Gewässern exponiert werden, um sichere Informationen über die tatsächlichen Effekte bei Umweltkonzentrationen zu bekommen. Denkbar wäre etwa, Chironomidenlarven in geeigneten Käfigen in belastete Gewässer einzubringen.

Vor allem ist jedoch, wie oben beschrieben, die weitestgehende Eliminierung von Pharmakarückständen aus den Abwässern nötig, um auf längere Sicht die Belastung der Gewässer zu vermindern.

- Konkreter Forschungsbedarf für die untersuchten Substanzen

##### a) Carbamazepin

Vor allem von Interesse ist der genaue Wirkmechanismus des Carbamazepins bei *C. riparius*. So wäre zu untersuchen, ob durch Gabe von Ecdysteroiden der Effekt aufgehoben werden kann oder ob ein anderer Wirkmechanismus vorliegt. Generell ist bekannt, dass Carbamazepin rezeptorvermittelt wirkt und mit einer Vielzahl von Rezeptoren interagiert (AMBROSIO ET AL. 2002, GRANGER ET AL. 1995, ICHIKAWA & MELTZER 1999, MARANGOS ET AL. 1983). Der Effekt auf die L4-Larven von *C. riparius* kann sich also mit einer direkten, hemmenden Wirkung auf den Ecdysteroid-Rezeptor erklären, aber auch durch Wirkung auf nachgeordnete Signalwege. Der konkrete Effekt bleibt zu ermitteln.

##### b) Fluoxetin

Über die Wirkung von Fluoxetin in Mollusken liegen hinreichend viele Angaben vor. So berichten FONG ET AL. (1993, 1994A, B, 1996A, B), FONG (1998, 2001) und KRANTIC ET AL. (1991) über die Wirkung von Fluoxetin oder Serotonin auf Mollusken. UHLER ET AL. (2000) berichten über die serotonin-imitierende Wirkung von Fluoxetin, so dass Effekte wie die von CSABA ET AL. (1976) beschriebene Wirkung auf *Tetrahymena* mit einiger Wahrscheinlichkeit auch durch Fluoxetin ausgelöst werden können.

FORAN ET AL. (2004) sowie BROOKS ET AL. (2003A, B) berichten über Effekte auf Fische und diverse Invertebraten. Die genauen Wirkmechanismen sind nicht bekannt. Nachdem jedoch sowohl Fluoxetin als auch Carbamazepin (ICHIKAWA & MELTZER 1999) auf den 5-HT- (Serotonin-)Rezeptor wirken, ist auch ein serotonin-vermittelter Wirkmechanismus denkbar. Dies bleibt zu untersuchen.

Clofibrinsäure und Ciprofloxacin haben in den durchgeführten Versuchen keine Effekte ausgelöst. Konkreter Forschungsbedarf zur Untersuchung von direkten organismischen Effekten kann somit nicht angegeben werden.

Für alle untersuchten Substanzen sind Monitoring-Programme erforderlich, um die mögliche Umweltgefahr solide beurteilen zu können. Beispielsweise liegen nur wenige MECs für Fluoxetin vor, aus Deutschland keine. Solche Daten sind jedoch zur Beurteilung der durch Pharmaka ausgelösten Umweltrisiken dringend erforderlich.

Angesichts der wachsenden Zahl von Nachweisen und festgestellten Effekten ist außerdem die Entwicklung von Methoden erforderlich, um Pharmaka effektiv aus Abwässern zu entfernen beziehungsweise sie von Anfang an von öffentlichen Abwassersystemen fernzuhalten.

#### 4.8.7 Eignung der Versuchstiere und Testsysteme

##### a) *Chironomus riparius*, *Potamopyrgus antipodarum* und *Lumbriculus variegatus*

*Chironomus riparius* hat sich als Standardtestorganismen bewährt (LEPPÄNEN & KUKKONEN 1998, GROENENDIJK ET AL. 1999, OECD 2004, OETKEN ET AL. 2005). Vorteil der Spezies ist, dass im Laborversuch einfach und ohne große Anforderungen an Haltung und Testaufbau ein kompletter Lebenszyklus abgebildet werden kann, der entsprechend Gelegenheit bietet, Effekte in verschiedenen Entwicklungsstadien aufzunehmen. Parallel dazu kann, da die Larven einzeln in die Systeme eingesetzt werden können, auch die direkte Toxizität überwacht werden. Das eingesetzte Testsystem hat sich ebenfalls bewährt. Versuchsaufbau und Sedimentzusammensetzung ermöglichen problemlos den Schlupf aller eingesetzten Larven. Unterschiede zwischen Lösemittelkontrolle und unbehandelter Kontrolle traten nicht auf.

*Potamopyrgus antipodarum* wird seit mehreren Jahren erfolgreich zur Testung endokriner Effekte von Xenobiotika eingesetzt (SCHULTE-OEHLMANN 1997, BROEKHUIZEN ET AL. 2001, DUFT ET AL. 2002, DUFT 2003, ALONSO & CAMARGO 2003). Die Präparation der Embryonen lässt die Tiere zu gut geeigneten Testorganismen für endokrin wirksame Substanzen werden, Gefährdungen der Population sind problemlos zu erkennen. In den Testsystemen sollte der Einsatz eines anderen Lösemittels erwogen werden, da beobachtet wurde, dass bei Ethanol sehr schnell Verkeimung der Ansätze auftrat. Ein Ersatz beispielsweise durch Ethylacetat ist zu prüfen. Im Übrigen jedoch ergibt sich aus dem problemlosen Überleben der Schnecken in den Testgefäßen, dass die Haltung der Tiere im Versuch für die Experimente geeignet ist. Über das Lösemittel hinaus erscheinen keine Verbesserungen angezeigt.

*Lumbriculus variegatus* haben sich als Testorganismen bewährt (PHIPPS ET AL. 1993, ASTM 1995, LEPPÄNEN & KUKKONEN 1998, WEST & ANKLEY 1998, EGELER ET AL. 1997, 1999, 2005, BRUST ET AL. 2001). Mögliche Änderungen am Testsystem wurden bereits unter 4.6.7.1 besprochen. Im Übrigen haben sich die Testsysteme bewährt. Die Wiederholung des Versuchs mit Ciprofloxacin belegt die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. *L. variegatus* ist als Modellorganismus für benthische Lebewesen geeignet, toxische Effekte auf Sedimentbewohner abzubilden.

##### b) *Blepharisma japonicum* und *Tetrahymena thermophila*

Beide Einzeller werden vielfach in Testsystemen genutzt. So nutzten LAWLER & MORIN (1993), LAW ET AL. (2000), DIEHL & FEISSEL (2001) UND FOX & MORIN (2001) *Blepharisma* als Versuchsorganismen in Experimenten zu den Dynamiken von Protistenpopulationen. Die

Anwendung als Testorganismus für Toxizitätstests stellt in dieser Form eine Neuentwicklung dar.

Die eingesetzten Pharmaka zeigten keine sichtbaren schädlichen Effekte auf *B. japonicum*. Eine sichere Aussage über die Eignung der Tiere kann daher nicht getroffen werden, allerdings reagierten sie auf Cadmium eindeutig und bewiesen somit, nicht in einer Weise schadstofftolerant zu sein, die sie für Toxizitätstests ungeeignet erscheinen ließe. Die Unempfindlichkeit gegenüber bestimmten Antibiotika ist bekannt (MARTI ET AL. 1979). Da Ciprofloxacin auf andere Weise wirkt, als die dort benutzten Antibiotika und für die übrigen Pharmaka ebenfalls andere Wirkungsweisen angenommen werden konnten, ist dies kein Hinderungsgrund, die Toxizität von Pharmaka an *Blepharisma* zu testen.

*Tetrahymena* dient seit langer Zeit als Testorganismus in Toxizitätstests (YOSHIOKA 1985, NILSSON 1989, PAULI 1994, BAMDAD ET AL. 1995, SCHULTZ 1997, LARSEN ET AL. 1997). Es werden dabei wechselnd *T. pyriformis* und *T. thermophila* eingesetzt. DAYEH ET AL. (2004) empfehlen *T. thermophila* für Toxizitätstests, auch NAŁĘCZ-JAWECKI & SAWICKI (2003) verwenden diese Art. PAULI & BERGER (1997) verglichen die Reaktionen mehrerer *Tetrahymena*-Arten in Toxizitätstests, sie fanden keine wesentlichen Unterschiede etwa zwischen *T. pyriformis* und *T. thermophila*. Die Gründe für die inkonsistenten Resultate dieser Untersuchungen sind, wie erläutert, in der Zusammensetzung des Mediums und der Schwierigkeit, sterile Kulturen zu erstellen, begründet. An der Eignung der Testorganismen an sich kann kein Zweifel herrschen.

## 5. Zusammenfassung

- 1.) Zahlreiche Medikamente werden nach Einnahme nahezu unverändert wieder ausgeschieden und gelangen über Abwasser und Kläranlagen in die aquatische Umwelt.
- 2.) Die gemessenen Konzentrationen erscheinen gegenüber anderen Kontaminantengruppen vergleichsweise niedrig, sind jedoch angesichts der Tatsache, dass Medikamente biologisch hoch aktive Substanzen sind, besorgniserregend. Das Beispiel Ethinylöstradiol zeigt, dass bereits im ng/l-Bereich Effekte auftreten. Abgesehen vom Beispiel Ethinylöstradiol lagen bislang keine Erkenntnisse über chronische Effekte von Medikamenten bei umweltrelevanten Konzentrationen vor.
- 3.) Die in der Umwelt festgestellten Arzneimittelwirkstoffe werden fast ausschließlich in Ab-, Oberflächen- und Grundwasser detektiert. Angaben über Medikamentanreicherungen in Sedimenten liegen nur vereinzelt vor.
- 4.) Angaben über die Ökotoxizität von Medikamenten beruhen bislang fast ausschließlich auf bei sehr hohen Substanzkonzentrationen durchgeführten Akuttests. Die Übertragung auf umweltrelevante Verhältnisse erfolgte durch Einbeziehung hoher Sicherheitsfaktoren.
- 5.) Die vorliegende Arbeit zeigt, dass in komplexeren Tests bereits bei sehr viel niedrigeren Konzentrationen Effekte auftreten. Diese Effekte sind nicht unmittelbar toxisch, beeinträchtigen jedoch die Entwicklung und Fortpflanzung der Versuchorganismen nachhaltig.
- 6.) Als Modellsubstanzen für die in Oberflächengewässern nachgewiesenen Pharmaka wurden das Antiepileptikum Carbamazepin, Clofibrinsäure als Metabolit zahlreicher Lipidsenker, das Antibiotikum Ciprofloxacin und das Antidepressivum Fluoxetin ausgewählt. Sämtliche Pharmaka werden in der Umwelt weit verbreitet nachgewiesen.
- 7.) Als Testorganismen dienten die Zuckmücke *Chironomus riparius*, die Zwergdeckelschnecke *Potamopyrgus antipodarum* und der aquatische Annelide *Lumbriculus variegatus*. *C. riparius* ist ein bereits standardisierter Versuchorganismus, *L. variegatus* ist zur Zeit im Standardisierungsverfahren (OECD 2004B) und für ökotoxikologische Untersuchungen empfohlen (ASTM 1995). Außerdem wurde mit den Einzellern *Blepharisma japonicum* und *Tetrahymena thermophila* ein Destruentenmikrokosmos entwickelt. Beide Einzeller sind ebenfalls erprobte Versuchorganismen (PAULI 1996, FOX & MORIN 2001).
- 8.) Von den vier untersuchten Pharmaka erwiesen sich im getesteten Konzentrationsbereich Carbamazepin und Fluoxetin für jeweils einen der Testorganismen als schädlich. Carbamazepin blockierte ab einer Sedimentkonzentration von 234 µg/kg Sediment (Trockengewicht) die Entwicklung von *C. riparius*. Fluoxetin führte ab einer Testkonzentration von 2 µg/l zu einer Reduzierung der Embryonenzahl bei *P. antipodarum*. Die EC<sub>10</sub> für Carbamazepin wurde zu 113 µg/kg Sediment berechnet, die EC<sub>10</sub> für Fluoxetin zu 0,81 µg/l. Beide Konzentrationen sind bei Berücksichtigung der im TGD vorgesehenen Sicherheitsfaktoren umweltrelevant (PEC/PNEC > 1). Als Grundlage dieser Berechnung dienten gemessene Umweltkonzentrationen im Sediment beziehungsweise Wasser. Ein negativer Effekt von Ciprofloxacin auf *L. variegatus* erschien anhand der Daten zwar möglich, konnte jedoch nicht statistisch belegt werden. Für Clofibrinsäure ergaben sich keine Hinweise auf negative Effekte im getesteten Konzentrationsbereich.



- 9.) Die vorliegenden Berechnungen sind weitaus tragfähiger als bisher vorliegende, da sie auf chronischen Toxizitätsdaten und gemessenen Umweltkonzentrationen beruhen, statt auf Akutdaten und geschätzten Umweltkonzentrationen.
- 10.) Die in den Versuchen festgestellten, sehr niedrigen Effektkonzentrationen lassen Effekte auch bei umweltrelevanten Konzentrationen als wahrscheinlich erscheinen. Indirekte Effekte wie vermindertes Futterangebot für Prädatoren oder Verschiebungen im Artenspektrum sind denkbar.
- 11.) Der Destruentenmikrokosmos erwies sich als prinzipiell geeignet, Effekte von Xenobiotika auf Einzeller zu untersuchen, da die Positivkontrolle funktionierte. Die Daten aus den Versuchsansätzen zeigen jedoch, dass Versuchsdesign und Haltung der Testorganismen weiter entwickelt werden müssen.
- 12.) Die vorliegenden Daten zeigen, dass Pharmaka bei umweltrelevanten Konzentrationen ein ökologisches Risiko darstellen können. Maßnahmen zur Risikominderung sind dringend erforderlich. Angesichts des therapeutischen Nutzens der Substanzen erscheinen Verbote nicht durchsetzbar.

## 6. Literaturverzeichnis

- AHRER, W.; SCHERWENK, E.; BUCHBERGER, W. (2001): Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr A* 910(1): 69-78
- AKTORIES, K.; FÖRSTERMANN, U.; HOFMANN, F.; FORTH, W. (2005): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban und Fischer Verlag, München, Jena.
- ALONSO, A.; CAMARGO, J. A. (2003): Short-term toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to the aquatic snail *Potamopyrgus antipodarum* (Hydrobiidae, Mollusca). *Bull Environ Cont Toxicol* 70(5): 1006-1012
- AMBROSIO, A. F.; SOARES-DA-SILVA, P.; CARVALHO, C. M.; CARVALHO, A. P. (2002): Mechanisms of action of carbamazepine and its derivatives, oxcarbazepine, BIA 2-093, and BIA 2-024. *Neurochem Res* 27(1-2): 121-130
- ANDREOZZI, R.; MAROTTA, R.; PAXEUS, N. (2003): Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* 2003(10): 1319-1330
- ARMITAGE, P. D.; CRANSTON, P. S.; PINDER, L. C. V. (1995): The Chironomidae. Biology and ecology of non-biting midges. Chapman & Hall, London
- ASP (1999): Arzneistoffprofile – Basisinformation über arzneiliche Wirkstoffe. - Loseblattsammlung der Arbeitsgemeinschaft Pharmazeutische Information (API) der Bundesvereinigung Dt. Apotheker-Arzneimittelkommission Dtsch. Apotheker, der Österr. Apothekerkammer und der Schweizer, HRSG.: DINNENDAHL, V. V.; FRICKE, U. Stammlieferung 1982, 14. Erg.-Lieferung; Frankfurt a. M., GOVI-Verlag, Pharmazeutischer Verlag
- ASTM (1995): E 1706-95a Standard test methods for measuring the toxicity of sediment-associated contaminations with freshwater invertebrates. American Society for Testing and Materials (ASTM), West Conshohocken, Pennsylvania
- BAMDAD, M.; DAVID, L.; GROLIÈRE, C. A. (1995): Epinigericin toxicity towards *Tetrahymena pyriformis* GL; changes in cell volume and intracellular pH. *Appl Microbiol Biotechnol* 44(1-2): 206-209
- BARONDES, S. H. (1994): Thinking about prozac. *Science* 263(5150): 1102-1103
- BARRETT, K.L.; GRANDY, N.; HARRISON, E.G.; HASSAN S.A.; OOMEN, P.A. (EDS.) (1994). Guidance document on regulatory testing procedures for pesticides and non-target arthropods. 28-30 March 1994, IAC Wageningen, The Netherlands
- BAT, L.; RAFFAELI, D. (1998): Survival and growth of *Corophium volutator* in organically enriched sediment: a comparison of laboratory and field experiments. *Tr J Zool* 1998(3): 219-229
- BAUER, B.; FIORONI, P.; SCHULTE-OEHLMANN, U.; OEHLMANN, J.; KALBFUS, W. (1997): The use of *Littorina littorea* for tributyltin (TBT) effect monitoring — results from the german TBT survey 1994/1995 and laboratory experiments. *Environ Pollut* 96(3): 299-309
- BAUMGARTNER, A.; PINNA, G.; HIEDRA, L.; GAIO, U.; HESSENIUS, C.; CAMPOS-BARROS, A.; ERAVCI, M.; PRENGEL, H.; THOMA, R.; MEINHOLD, H. (1997): Effects of lithium and carbamazepine on thyroid hormone metabolism in rat brain. *Neuropsychopharmacology*. 1997 16(1): 25-41
- BELFROID, A.; VAN DER HORST, A.; VETHAAK, A. D.; SCHAFER, A. J.; RIJS, G. B.; WEGENER, J.; COFINO, W. P. (1999): Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in the Netherlands. *Sci Total Environ* 225(1-2): 101-108
- BOYD, G. R.; REEMTSMA, H.; GRIMM, D. A.; MITRA, S. (2003): Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. *Sci Total Environ* 135(1-3): 135-149

- BRAKEFIELD, P. M.; MAZOTTA, V. (1995): Matching field and laboratory environments: effects of neglecting daily temperature variation on insect reaction norms. *J Evol Biol* 8(5): 559-573
- BROEKHUIZEN, N.; PARKYN, S.; MILLER, D. (2001): Fine sediment effects on feeding and growth in the invertebrate grazers *Potamopyrgus antipodarum* (Gastropoda, Hydrobiidae) and *Deleatidium* sp. (Ephemeroptera, Leptophlebiidae). *Hydrobiologia* 457(1-3): 125-132
- BROOKS, B. W.; TURNER, P. K.; STANLEY, J. K.; WESTON, J. J.; GLIDEWELL, E. A.; FORAN, C. M.; SLATTERY, M.; LA POINT, T. W.; HUGGETT, D. B. (2003A): Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms. *Chemosphere* 52(1): 135-142
- BROOKS, B. W.; FORAN, C. M.; RICHARDS, S. M.; WESTON, J.; TURNER, P. K.; STANLEY, J. K.; SOLOMON, K. R.; SLATTERY, M.; LA POINT, T. W. (2003B): Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Tox Lett* 142: 169-183
- BRUCHHAUSEN, F. V.; DANNHARDT, G.; EBEL, S.; FRAHM, A. W.; HACKENTHAL, E.; HOLZGRABE, U. (1993): Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Bd. 8. Springer Verlag, Berlin u. a.
- BRUCKER-DAVIS, F. (1998): Effects of environmental synthetic chemicals on thyroid function. *Thyroid* 8(9): 827-856
- BRUST, K.; LICHT, O.; HULTSCH, V.; JUNGSMANN, D.; NAGEL, R. (2001): Effects of terbutryn on aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in artificial indoor streams. *Environ Toxicol Chem* 20: 2000-2007
- BUSER, H. R.; MÜLLER, M. D. (1998): Occurrence of the pharmaceutical drug clofibric acid and the herbicide mecoprop in various Swiss lakes and in the north sea. *Environ Sci Technol* 32(1): 188-192
- CALAMARI, D.; ZUCCATO, E.; CASTIGLIONI, S.; BAGNATI, R.; FANELLI, R. (2003): Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers po and lambro in northern Italy. *Environ Sci Technol* 37(7): 1241-1248
- CARDOZA, L. A. ; KNAPP, C. W.; LARIVE, C. K.; BELDEN, J. B.; LYDY, M.; GRAHAM, D. W. (2005) : Factors affecting the fate of ciprofloxacin in aquatic field systems. *Water Air Soil Pollut* 161: 383-398
- CHU, N.-S. (1979): Carbamazepine: prevention of alcohol withdrawal seizures. *Neurology* 29: 1397-1401
- CHU, Y.-W.; HOUANG, E. T. S.; LYON, D. J.; LING, J. M.; NG, T.-K.; CHENG, A. F. B. (1998): Antimicrobial resistance in *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* in Hong Kong, 1986 to 1995. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42(2): 440-443
- CLEUVERS, M. (2003): Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Tox Lett* 142(3): 185-194
- CONNELL, J. M.; RAPEPORT, W. G.; BEASTALL, G. H.; BRODIE, M. J.(1984): Changes in circulating androgens during short term carbamazepine therapy. *Br J Clin Pharmacol.* 17(3): 347-351
- CONSOLO, S.; BIANCHI, S.; LADINSKY, H. (1976): Effect of carbamazepine on cholinergic parameters in rat brain areas. *Neuropharmacology* 15(11): 653-657
- COUPER, J. M.; LEISE, E. M. (1996): Serotonin injections induce metamorphosis in larvae of the gastropod mollusc *Ilyanassa obsoleta*. *Biol Bull* 191(2): 178-186
- CSABA, G.; NAGY, U.; LANTOS, T. (1976): Are biogenic amines acting on *Tetrahymena* through a cyclic AMP mechanism? *Acta biol med germ* 35: 259-261
- CULP, J. M.; LOWELL, R. B.; CASH, K. J. (2000): Integrating mesocosm experiments with field and laboratory studies to generate weight-of-evidence risk assessments for large rivers. *Environ Toxicol Chem* 19(4): 1167-1173

- DAYEH, V. R.; CHOW, S. L.; SCHIRMER, K.; LYNN, D. H.; BOLS, N. C. (2004): Evaluating the toxicity of Triton X-100 to protozoan, fish, and mammalian cells using fluorescent dyes as indicators of cell viability. *Ecotox Environ Saf* 57(3): 375-382
- DEMOLL, R. (1954): Viren, Hormone, Wuchsstoffe und Antibiotica im Abwasser. *gwf Wasser Abwasser, Ausgabe Wasser* 95(4): 97-100
- DIEHL, S.; FEISSEL, M. (2001): Intraguild prey suffer from enrichment of their resources: A microcosm experiment with ciliates. *Ecology* 82(11): 2977-2983
- DUFT, M.; TILLMANN, M.; SCHULTE-OEHLMANN, U.; MARKERT, B. (2002): Entwicklung eines Sedimentbiotests mit der Zwergdeckelschnecke *Potamopyrgus antipodarum*. *UWSF* 14(1): 12-17
- DUFT, M. (2003): Ökotoxikologische Sedimentbewertung großer Fließgewässer mit Nematoden und Gastropoden - vom Biotest zum Freiland. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- ECB (2003): 2nd edition of the Technical Guidance Document (TGD) on risk assessment of chemical substances following European regulations and directives. European Chemicals Bureau, JRC-Ispra (VA), Italy
- EGELER, P.; RÖMBKE, J.; MELLER, M.; KNACKER, T.; FRANKE, C.; STUDINGER, G.; NAGEL, R. (1997): Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene to tubificid sludgeworms (*Oligochaeta*) under standardised laboratory conditions. *Chemosphere* 35: 835-852
- EGELER, P.; RÖMBKE, J.; MELLER, M.; KNACKER, T.; NAGEL, R. (1999): Bioaccumulation test with tubificid sludgeworms in artificial media – development of a standardisable method. *Hydrobiologia* 406: 271-280
- EGELER, P.; MELLER, M.; SCHALLNASS, H.; GILBERG, D. IN CO-OPERATION WITH KARAOGLAN, B.; NAGEL, R. (2005): Validation of a Sediment Toxicity Test With the Endobenthic Aquatic *Oligochaete Lumbriculus variegatus* by an International Ring Test (Durchführung eines Laborvergleichstests zur Bestimmung der Toxizität von Chemikalien bei endobenthischen Organismen - Validierung eines endobenthischen Sedimenttests durch einen internationalen Ringtest). Report FKZ 202 67 429, Umweltbundesamt, Berlin, Germany
- ELLIOTT, A. M. (1973): *Biology of Tetrahymena*. Dowden, Hutchinson & Ross, Inc. Stroudsburg, Pennsylvania.
- EMA (2005): Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use. European Medicines Agency, London
- EPSTEIN, S.S.; SAPOROSCHETZ, I. B.; HUTNER, S.H. (1967): Toxicity of antioxydants to *Tetrahymena pyriformis*. *J Protozool* 14(2): 238-244
- FALNIOWSKI, A. (1979): A male of *Potamopyrgus jenkinsi* (Smith, 1889) in Poland. *Basteria* 43: 109-111
- FDA (2003): Sales and use of fluoxetine in children, adolescents and women of child-bearing age. Food and Drug Administration Division of Surveillance, Research and Communication Support, Office of Drug Safety. Rockville, MD
- FEELY, M. (1999): Fortnightly review: Drug treatment of epilepsy. *BMJ* 318(7176): 106-109
- FERRARI, B.; MONS, R.; VOLLAT, B.; FRAYSSE, B.; PAXEUS, N.; LO GIUDICE, R. POLLIO, A.; GARRIC, J. (2004): Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? *Environ Toxicol Chem* 23(5): 1344-1354
- FIEDLER, H. J.; RÖSLER, H. J. (1993): *Spurenelemente in der Umwelt*. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart
- FLORIN-CHRISTENSEN, M.; FLORIN-CHRISTENSEN, J.; TIEDTKE, A.; RASMUSSEN, L. (1989): New aspects of extracellular hydrolytic enzymes in lower eukaryotes. *Eur. J. Cell. Biol.* 48: 1-4

- FONG, P. P.; WALL, D. M.; RAM, J. L. (1993): Characterization of serotonin receptors in the regulation of spawning in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). J Exp Zool 267: 475-482
- FONG, P. P.; DUNCAN, J.; RAM, J. L. (1994A): Inhibition and sex specific induction of spawning by serotonergic ligands in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). Experimentia 50: 506-509
- FONG, P. P.; KYOZUKA, K.; ABDELGHANI, H.; HARDEGE, J. D.; RAM, J. L. (1994B): In vivo and in vitro induction of germinal vesicle breakdown in a freshwater bivalve, the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). J Exp Zool 269: 467-474
- FONG, P. P.; DEGUCHI, R.; KYOZUKA, K. (1996A): Serotonergic ligands induce spawning but not oocyte maturation in the bivalve *Macra chinensis* from central Japan. Biol Bull 191(1): 27-32
- FONG, P. P.; WADE, S.; ROSTAFIN, M. (1996B): Characterization of serotonin receptor mediating parturition in fingernail clams *Sphaerium (Musculinum)* spp. from eastern North America. J Exp Zool 275: 326-330
- FONG, P. P. (1998): Zebra mussel spawning is induced in low concentrations of putative serotonin reuptake inhibitors. Biol Bull 194(2): 143-149
- FONG, P. P. (2001): Antidepressants in aquatic organisms: A wide range of effects. In: Pharmaceuticals and personal care products in the environment. Scientific and regulatory issues. DAUGHTON, C. G.; JONES-LEPP, T. L. Washington, American Chemical Society: 265-281
- FORAN, C. M.; WESTON, J.; SLATTERY, M.; BROOKS, B. W.; HUGGETT, D. B. (2004): Reproductive assessment of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) following a four-week fluoxetine (SSRI) exposure. Arch Environ Cont Toxicol 46(4): 511-517
- FORMAN, B. M.; CHEN, J.; EVANS, R. M. (1997): Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. PNAS 94(9): 4312-4317
- FÖRSTER, B.; VAN GESTEL, C. A. M.; KOOLHAAS, J. E.; NENTWIG, G.; RODRIGUES, J. M. L.; SOUSA, J. P.; JONES, S. E.; KNACKER, T. (2004): Ring-testing and field-validation of a Terrestrial Model Ecosystem (TME) - An instrument for testing potentially harmful substances: effects of carbendazim on organic matter breakdown and soil fauna feeding activity. Ecotoxicology 13(1 - 2): 129-141
- FORSGRÉN, A.; BREDBERG, A.; PARDEE, A. B.; SCHLOSSMAN, S. F.; TEDDER, T. F. (1987): Effects of ciprofloxacin on eucaryotic pyrimidine nucleotide biosynthesis and cell growth. Antimicrob. Agents Chemother. 31(5): 774-779
- FORTH, W.; HENSCHLER, D.; RUMMEL, W. (1990): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie : für Studenten d. Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie, Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte u. Apotheker. 5. Aufl. Mannheim [u.a.]: Bibliograph. Inst.
- FOX, J. W.; MORIN, P. J. (2001): Effects of intra- and interspecific interactions on species responses to environmental change. J Anim Ecology 70: 80-90
- FRANKEL, J. (2000): Cell biology of *Tetrahymena thermophila*. In : ASAI, D. J.: *Tetrahymena thermophila*. Methods in Cell Biology, Vol. 62. Acad. Press, San Diego
- FRENZEL, P. (1979): Untersuchungen zur Biologie und Populationsdynamik von *Potamopyrgus jenkinsi* (Smith) (Gastropoda: Prosobranchia) im Litoral des Bodensees. Arch Hydrobiol 85(4): 448-464
- FRETTER, V.; GRAHAM, A. (1994): British prosobranch molluscs. The Ray Society, London
- FRIEDMANN, P. S.; STRICKLAND, I.; PIRMOHAMED, M.; PARK, B. K. (1994): Investigation of mechanisms in toxic epidermal necrolysis induced by carbamazepine. Arch Dermatol 130(5): 598-604

- FUHRMANN, B. (1999): Vergleichende Untersuchung von Oberflächengewässern in Athen und Berlin auf Arzneimittelrückstände aus kommunalen Kläranlagen. Diplomarbeit, TU Berlin
- GALTON, V. A. (1992): The role of thyroid hormone in amphibian metamorphosis. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 3(3): 96-100
- GARCIA-COLUNGA, J.; AWAD, J. N.; MILEDI, R. (1997): Blockage of muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors by fluoxetine (Prozac). *PNAS* 94(5): 2041-2044
- GARDINER, D. M.; HOPPE, D. M. (1999): Environmentally induced limb malformations in mink frogs (*Rana septentrionalis*). *J Exp Zool* 284(2): 207-216
- GARRISON, A. W. ; POPE, J. D. ; ALLEN, F. R. (1976) : GC/MS analysis of organic compounds in domestic wastewaters. In: Keith, L. H.: Identification & analysis of organic pollutants in water. Ann Arbor Science Publishers, Inc. Ann Arbor, Michigan. S. 517-556
- GASTMEIER, P.; MEYER, E.; SCHWAB, F.; GEFFERS, C.; RÖDEN, H.; DASCHNER, F. (2004): KISS und SARI: Benchmarking und Referenzdaten für Krankenhausinfektionen, Antibiotika-Verbrauch und Resistenz auf deutschen Intensivstationen. *Intensivmed Notfall-med* 41(3): 133-138
- GIESE, A. C. (1973): *Blepharisma*. The Biology of a Light-Sensitive Protozoan. Stanford University Press, Stanford, CA
- GOLET, E. M.; ALDER, A. C.; HARTMANN, A.; TERNES, T.A.; GIGER, W. (2001): Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Chem* 73(15): 3632-3638
- GOLET, E. M.; XIFRA, I.; SIEGRIST, H.; ALDER, A. C.; GIGER, W. (2003): Environmental Exposure Assessment of Fluoroquinolone Antibacterial Agents from Sewage to Soil. *Environ Sci Technol* 37(6): 3243-3249
- GONZÁLEZ, M. P.; DÍAZ, H. G.; CABRERA, M. A.; RUIZ, R. M. (2004): A novel approach to predict a toxicological property of aromatic compounds in the *Tetrahymena pyriformis*. *Bioorg Med Chem* 12: 735-744
- GRANGER, P.; BITON, B.; FAURE, C.; VIGE, X.; DEPOORTERE, H.; GRAHAM, D.; LANGER, S. Z.; SCATTON, B.; AVENET, P. (1995): Modulation of the gamma-aminobutyric acid type A receptor by the antiepileptic drugs carbamazepine and phenytoin. *Mol Pharmacol* 47(6): 1189-1196
- GROENENDIJK, D.; KRAAK, M. H. S.; ADMIRAAL, W. (1999): Efficient shedding of accumulated metals during metamorphosis in metal-adapted populations of the midge *Chironomus riparius*. *Environ Toxicol Chem* 18(6): 1225-1231
- HANISCH, B.; ABBAS, B.; KRATZ, W. (2002): Ökotoxikologische Bewertung von Humanarzneimitteln in aquatischen Ökosystemen. Landesumweltamt, Potsdam
- HANLEY, K.; JIANG, Y.; CRUMRINE, D.; BASS, N. M.; APPEL, R.; ELIAS, P. M.; WILLIAMS, M. L.; FEINGOLD, K. R. (1997): Activators of the nuclear hormone receptors PPAR alpha and FXR accelerate the development of the fetal epidermal permeability barrier. *J Clin Invest* 100(3): 705-712
- HARTKE, K.; MUTSCHLER, E. (HRSG.) (1993): Deutsches Arzneibuch DAB 10 - Kommentar, 10. Ausgabe, Bd. II und III, Grundlfg. 1991, 3. Erg.-Lfg. 1993, Deutscher Apotheker-Verlag, Stuttgart
- HARTMANN, A.; GOLET, E. M.; GARTISER, S.; ALDER, A. C.; KOLLER, T.; WIDMER, R. M. (1999): Primary DNA damage but not mutagenicity correlates with ciprofloxacin concentrations in German hospital wastewaters. *Arch Environ Cont Toxicol* 36(2): 115-119
- HAUER, F. R.; BENKE, A. C. (1991): Rapid growth of snag-dwelling chironomids in a blackwater river: the influence of temperature and discharge. *J North Am Bent Soc* 10(2): 154-164

- HAUPTMANN, U. (2000): Kontinuierliche Co-Kultur von *Tetrahymena thermophila* und *Pseudomonas putida* in einem Bioreaktor. Dissertation, Justus Liebig-Universität, Gießen
- HAYES, T. B. COLLINS, A.; LEE, M.; MENDOZA, M.; NORIEGA, N.; STUART, A. A.; VONK, A. (2002): Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. PNAS 99(8): 5476-5480
- HEBERER, TH.; STAN, H.J. (1997): Determination of clofibric acid and N-(Phenylsulfonyl)-sarcosine in sewage, river and drinking water. Int J Environ Anal Chem, 67, 113-124
- HEBERER, T., STAN, H. J. (1998): Arzneimittelrückstände im aquatischen System. Wasser und Boden 4: 20-25
- HEBERER, T.; REDDERSEN, K; MECHLINSKI, A. (2002): From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas. Water Sci Technol 46(3): 81-88
- HECKER, V. (2004): Effekte von Arzneimittelrückständen in der aquatischen Umwelt. Diplomarbeit, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- HEROLD, C.; OCKERA, M.; GANSLMAYER, M.; GERAUER, H.; HAHN, E. G.; SCHUPPAN, D. (2002): Ciprofloxacin induces apoptosis and inhibits proliferation of human colorectal carcinoma cells. Brit J Cancer 86: 443-448
- HESSLING, R.; MÜLLER, M. C.; WESTHEIDE, W. (1999): CLSM analysis of serotonin-immunoreactive neurons in the central nervous system of *Nais variabilis*, *Slavina appendiculata* and *Stylaria lacustris* (Oligochaeta: Naididae). Hydrobiologia 406(0): 223-233
- HIGNITE, C.; AZARNOFF, D. L (1977): Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. Life Sciences 20: 337-342
- HILL, D. L. (1972): The biochemistry and physiology of *Tetrahymena*. (Serie: Cell Biology: A Series of Monographs). Acad. Press, New York
- HIORNS, W. D.; METHE, B. A.; NIERZWICKI-BAUER, S. A. ; ZEHR, J. P. (1997): Bacterial diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. Appl Environ Microbiol 63(7): 2957-2960
- HLUG (2004): Hessischer Gewässergütebericht zum Hessentag 2004. Hessisches Landesamt für Umwelt und Geologie, Wiesbaden
- HOUSE OF LORDS SELECT COMMITTEE APPOINTED TO CONSIDER SCIENCE AND TECHNOLOGY (1998): Resistance to antibiotics and other antimicrobial agents. Report, London
- HUPPERT, N. (1999): Elimination von Ibuprofen und NBBS in kommunalen Kläranlagen analysiert mittels Festphasenextraktion. Oldenbourg, München, Wien. (Schriftenreihe des ISWW Karlsruhe; Bd. 95)
- ICHIKAWA, J.; MELTZER, H. Y. (1999): Valproate and carbamazepine increase prefrontal dopamine release by 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation. Eur J Pharmacol 380(1): R1-R3
- INSTITUT FÜR DIE ARZNEIMITTELVERORDNUNG IN DER GESETZLICHEN KRANKENVERSICHERUNG (2002): Vorschlagsliste verordnungsfähiger Arzneimittel, Berlin
- ISOJARVI, J. I.; LAATIKAINEN, T. J.; PAKARINEN, A. J.; JUNTUNEN, K. T.; MYLLYLÄ, V. V. (1995): Menstrual disorders in women with epilepsy receiving carbamazepine. Epilepsia 36(7): 676-681
- IWAMATSU, T.; TOYA, Y.; SAKAI, N.; YASUTAKA, T.; NAGATA, R.; NAGAHAMA, Y. (1993): Effect of 5-hydroxytryptamine on steroidogenesis and oocyte maturation in pre-ovulatory follicles of the medaka *Oryzias latipes*. Dev Growth Differ 35, 625-630
- JOFFE, R.T.; GOLD, P. W.; UHDE, T. W.; POST, R. M. (1984): The effects of carbamazepine on the thyrotropin response to thyrotropin-releasing hormone. Psychiatry Res 12(2): 161-166

- KIMURA, T.; MATSUI, K.; SATO, T.; YOSHINAGA, K. (1974): Mechanism of carbamazepine (Tegretol®)-induced antidiuresis: evidence for release of antidiuretic hormone and impaired excretion of a water load. *J Clin Endocrinol Metab* 1974 38(3): 356-362
- KOLPIN, D. W.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; THURMAN, E. M.; ZAUGG, S. D.; BARBER, L. B.; BUXTON, H. T. (2002): Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environ Sci Technol* 36(6): 1202-1211
- KRANTIC, S.; DUBÉ, F.; QUIRION, R.; GUÉRRIER, P. (1991): Pharmacology of the serotonin-induced meiosis reinitiation in *Spisula solidissima* oocytes. *Dev Biol* 146: 491-498
- KÜMPEL, T.; KÜMMERER, K.; DASCHNER, F. (1999): Drug-Monitoring: Entwicklung einer analytischen Methode zur schnellen Bestimmung von Chinolonen in Serum und Sputum. Antibiotika-Screening, Forschungsbericht, Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene, Uniklinikum Freiburg, 1999, S. 20-21
- KÜMMERER, K. (2003): Significance of antibiotics in the environment. *J Antimicrob Chemother* 52(1): 5-7
- LARSEN, J.; SCHULTZ, T. W.; RASMUSSEN, L.; HOOFTMAN, R.; PAULI, W. (1997): Progress in an ecotoxicological standard protocol with protozoa: results from a pilot ringtest with *Tetrahymena pyriformis*. *Chemosphere* 35(5): 1023-1041
- LAW, R.; WEATHERBY, A. J.; WARREN, P. H. (2000): On the invasibility of persistent protist communities. *Oikos* 88(2): 319-326
- LAWLER, S. P. MORIN, P. (1993): Food web architecture and population dynamics in Laboratory Microcosms of Protists. *Am Natural* 141(5): 675-686
- LEE, W.; ARNOLD, C. (1983): Chronic toxicity of ocean-dumped pharmaceutical wastes to the marine amphipod *Amphithoe valida*. *Mar Pollut Bull* 14(4): 150-153
- LEE, W.; BIRD, J. L. (1985): Pharmaceutical wastes at the Puerto Rico dumpsite: sublethal effects on a marine plankton copepod, *Temora turbinata*. In: *Wastes in the ocean, Vol. 5: Deep sea waste disposal*. Wiley, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. S. 227-240
- LENIHAN, H. S.; KEST, K. A.; CONLAN, K. E.; SLATTERY, P. N.; KONAR, B. H.; OLIVER, J. S. (1995): Patterns of survival and behavior in antarctic benthic invertebrates exposed to contaminated sediments: field and laboratory bioassay experiments. *J Exp Mar Biol Ecol* 192(2): 233-255
- LEPPÄNEN, M. T.; KUKKONEN, J. V. K. (1998): Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of the oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377:183-194
- LIMA, A.; LIMA, N.; PINHO, M.; BARROS JUNIOR, E.; TEIXEIRA, M.; MARTINS, M.; GUERRANT, R. (1995): High frequency of strains multiply resistant to ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, streptomycin, chloramphenicol, and tetracycline isolated from patients with shigellosis in northeastern Brazil during the period 1988 to 1993. *Antimicrob Agents Chemother* 39(1): 256-259
- LÖFFLER, D. (2003): Fate of human and veterinary pharmaceuticals in water/sediment test systems by analysis via LC-tandem MS and Radio-TLC. Ph. D. Thesis, Dept. of Chemistry/Pharmacy. Johannes-Gutenberg-University, Mainz
- LÖFFLER, D.; RÖMBKE, J.; MELLER, M.; TERNES, T. A. (2005): Environmental Fate of Pharmaceuticals in Water/Sediment Systems. *Environ Sci Technol* 39: 5209-5218
- MAGGIOLO, F.; PURICELLI, G.; DOTTORINI, M.; CAPRIOLI, S.; BIANCHI, W.; SUTER, F. (1991): The effect of ciprofloxacin on oral contraceptive steroid treatments. *Drugs Exp Clin Res* 17(9): 451-454
- MARANGOS, P. J.; POST, R.; PATEL, J.; ZANDER, K.; PARMA, A.; WEISS, S. (1983): Specific and potent interactions of carbamazepine with brain adenosine receptors. *Eur J Pharmacol* 93 (3-4): 175-182



- MARTI, E. J.; SLAVIN, R. J.; HIRSHFIELD, H. I. (1979): Improved method for axening *Blepharisma* by means of antibiotics. J Protozool 26(1): 133-134
- MCDERMOTT, P. F.; BODEIS, S. M.; ENGLISH, L. L.; WHITE, D. G.; WALKER, R. D.; ZHAO, S.; SIMJEE, S.; WAGNER, D. D. (2002): Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* evolves rapidly in chickens treated with fluoroquinolones. J Infect Dis 185(6): 837-840
- MEDAWAR, C. (1994): Through the doors of perception? Nature 368: 369-370
- MEISENHEIMER, M.; TERNES, T. A. (2000): Verfahren zur Bestimmung der Antiepileptika Carbamazepin und Primidon in Wasser mittels GC/MS nach Derivatisierung. Vom Wasser 94: 203-212
- MERSMANN, P. (2003): Transport- und Sorptionsverhalten der Arzneimittelwirkstoffe Carbamazepin, Clofibrinsäure, Diclofenac, Ibuprofen und Propyphenazon in der wasser-gesättigten und -ungesättigten Zone. Dissertation, Technische Universität Berlin
- METCALFE, C. D.; MIAO, X.-S.; KOENIG, B. G.; STRUGER, J. (2003): Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. Environ Toxicol Chem 22(12): 2881-2889
- MÖBIUS, E.; LEOPOLD, H. C.; PAULUS, W. M. (1984): Die Behandlung der typischen Trigemiusneuralgie. Fortschr Med 38: 935-939
- MÖHLE, E.; KEMPTER, C.; KERN, A.; METZGER, J. W. (1999): Untersuchungen zum Abbau von Pharmaka in kommunalen Kläranlagen mit HPLC-Electrospray-Massenspektrometrie. Acta Hydrochim Hydrobiol 27 (6):430 - 436
- MONTGOMERY, S. A.; SCHATZBERG, A. F.; GUELF, J. D.; KASPER, S.; NEMEROFF, C.; SWANN, A.; ZAJECKA, J. (2000): Pharmacotherapy of depression and mixed states in bipolar disorder. J Affect Disord 59: S39-S56
- MORIN, P. (1999): Productivity, intraguild predation, and population dynamics in experimental food webs. Ecology 80(3): 752-760
- MUTSCHLER, E. (1991): Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 6. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- NALECZ-JAWECKI, G.; SAWICKI, J. (2003): The Toxicity of selected Pharmaceuticals to the Protozoa *Spirostomum ambiguum* and *Tetrahymena thermophila*. Fresenius Environ Bull 12(8): 840-843.
- NENTWIG, G. ; OETKEN, M. ; OEHLMANN, J. (2004): Effects of Pharmaceuticals on Aquatic Invertebrates – The Example of Carbamazepine and Clofibric Acid. In: Kümmerer, K. (ed.): Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risks. 2nd Edition, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. S. 195-208
- NENTWIG, G.; HECKER, V.; OETKEN, M.; OEHLMANN, J. (2005): Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part II: The antidepressant drug fluoxetine. AECT, submitted
- NILSSON, J. R. (1989): *Tetrahymena* in cytotoxicology: with special reference to effects of heavy metals and selected drugs. Eur J Protistol 25: 2-25
- NTP-CERHR-FLUOXETINE (2004): NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of fluoxetine. U.S. Department of Health and Human Services, the national toxicology-program center for the evaluation of risks to human reproduction. Online (6. August 2004): <http://cerhr.niehs.nih.gov>
- OAKS, J. L.; GILBERT, M.; VIRANI, M. Z.; WATSON, R. T.; METEYER, C. U.; RIDEOUT, B. A.; SHIVAPRASAD, H. L.; AHMED, S.; IQBAL CHAUDHRY, M. J.; ARSHAD, M.; MAHMOOD, S.; ALI, A.; AHMED KHAN, A. (2004): Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. Nature 427(6975): 630-633
- OECD (2004): OECD Guidelines for the testing of chemicals: Proposal for a new guideline 218. Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment. OECD, Paris

- OEHLMANN, J.; FIORONI, P.; STROBEN, E.; MARKERT, B. (1996): Tributyltin (TBT) effects on *Ocenebrina aciculata* (Gastropoda: Muricidae): imposex development, sterilization, sex change and population decline. *Sci Total Environ* 188(2-3): 205-223
- OETKEN, M.; LUDWICHOWSKI, K. U.; NAGEL, R. (2001): Validation of the preliminary EU-concept of as-sessing the impact of chemicals to organisms in sediment by using selected substances. Report R&D project 29967411, German Federal Environment Agency, Berlin
- OETKEN, M.; NENTWIG, G.; LÖFFLER, D.; TERNES, T. A.; OEHLMANN, J. (2005): Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part I: the antiepileptic drug carbamazepine. *Arch Environ Cont Toxicol* 49: 353-361
- OLFSON, M.; MARCUS, S. C.; PINCUS, H. A.; ZITO, J. M.; THOMPSON, J. W.; ZARIN, D. A. (1998): Antidepressant prescribing practices of outpatient psychiatrists. *Arch Gen Psychiatry* 55(4): 310-316
- OPITZ, R.; BRAUNBECK, T.; BÖGI, C.; PICKFORD, D. B.; NENTWIG, G.; OEHLMANN, J.; TOOI, O.; LUTZ, I.; KLOAS, W. (2005): Description and initial evaluation of a *Xenopus* metamorphosis assay for detection of thyroid-system-disrupting activities of environmental compounds. *Environ Toxicol Chem* 24(3): 653-664
- ORIAS, E.; HAMILTON, E. P.; ORIAS, J. D. (2000): *Tetrahymena* as a laboratory organism: useful strains, cell culture and cell line maintenance. In: ASAI, D. J.: *Tetrahymena thermophila*. *Methods in Cell Biology*, Vol. 62. Acad. Press, San Diego
- OUELLET, M.; BONIN, J.; RODRIGUE, J.; DESGRANGES, J.; LAIR, S. (1997): Hindlimb deformities (ectromelia, ectrodactyly) in free-living anurans from agricultural habitats. *J Wildl Dis* 33(1): 95-104
- PAULI, W. (1994): Einzeller als Bioindikatoren umweltgefährdender Stoffe. Dissertation, Freie Universität, Berlin
- PAULI, W. (1996): Proceedings of the International workshop on a protozoan test protocol with *Tetrahymena* in aquatic toxicity testing. Forschungsbericht 106 99 999/03. Umweltbundesamt, Berlin
- PAULI, W.; BERGER, S. (1997): Toxicological comparisons of *Tetrahymena* species, end points and growth media: supplementary investigations to the pilot ring test. *Chemosphere* 35(5): 1043-1052
- PERTY, M. (1849): Mikroskopische Organismen der Alpen und der italienischen Schweiz. *Mitt Naturforsch Gesell Bern* 164/165: 151-176
- PERTY, M. (1852): Zur Kenntnis kleinster Lebensformen nach Bau: Funktionen, Systematik mit Spezialverzeichnis der in der Schweiz. Bern, 248 pp.
- PHILLIPS, G.; JOHNSON, B.; FERGUSON, J. (1990): The loss of antibiotic activity of ciprofloxacin by photodegradation. *J. Antimicrob. Chemother.* 26(6): 783-789
- PHIPPS, G. L.; ANKLEY, G.T.; BENOIT, D. A.; MATTSON, V. R. (1993): Use of the aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. *Environ Toxicol Chem* 12: 269-279
- PONDER, W. F. (1988): *Potamopyrgus antipodarum* - A molluscan coloniser of europe and australia. *J Moll Stud* 54: 271-285
- RICHARDS, S. M.; WILSON, C. J.; JOHNSON, D. J.; CASTLE, D. M.; LAM, M.; MABURY, S. A.; SIBLEY, P. K.; SOLOMON, K. R. (2004): Effects of Pharmaceutical Mixtures in Aquatic Microcosms. *Environ Toxicol Chem* 23(4): 1035-1042
- RICHARDSON, M. L.; BOWRON, J. M. (1985): The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *J Pharm Pharmacol* 37: 1-12
- RIESBECK, K.; SIGVARDSSON, M.; LEANDERSON, T.; FORSGREN, A. (1994): Superinduction of cytokine gene transcription by ciprofloxacin. *J Immunol* 153(1): 343-352
- RODRIGUEZ, N.; RENAUD, F. (1980): On the possible role of serotonin in the regulation of regeneration of cilia. *J Cell Biol* 85(2): 242-247

- ROGERS, I. N.; BIRTWELL, I. K.; KRUYNSKI, G. M. (1986): Organic extractables in municipal wastewater Vancouver, British Columbia. *Water Poll Res J Canada* 21(2): 187-204
- ROUTLEDGE, E. J.; SHEAHAN, D.; DESBROW, C.; BRIGHTY, G. C.; WALDOCK, M.; SUMPTER, J. P. (1998): Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environ Sci Technol* 32(11): 1559-1565
- RUBINS, H. B.; ROBINS, S. J.; COLLINS, D.; FYE, C. L.; ANDERSON, J. W.; ELAM, M. B.; FAAS, F. H.; LINARES, E.; SCHAEFER, E. J.; SCHECTMAN, G.; WILT, T. J.; WITTES, J.; THE VETERANS AFFAIRS HIGH-DENSITY LIPOPROTEIN CHOLESTEROL INTERVENTION TRIAL STUDY GROUP (1999): Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. *N Engl J Med* 341(6): 410-418
- SACHER, F.; LOCHOW, E.; BETHMANN, D.; BRAUCH, H.-J. (1998): Vorkommen von Arzneimittelwirkstoffen in Oberflächengewässern. *Vom Wasser* 90: 233-243
- SACHER, F. (2002): Vorkommen von Arzneimittelrückständen in Grund- und Oberflächenwässern in Baden-Württemberg. *Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft* 168: 59-69
- SATTELBERGER, R. (1999): Arzneimittelrückstände in der Umwelt, Bestandsaufnahme und Problemdarstellung. Umweltbundesamt GmbH, Wien
- SAUVANT, M. P.; PEPIN, D.; BOHATIER, J.; GROLIERE, C. A. (1995): Microplate technique for screening and assessing cytotoxicity of xenobiotics with *Tetrahymena pyriformis*. *Ecotox Environ Saf* 32: 159-165
- SCHARF, S.; LOOS, S.; UHL, M.; KREUZINGER, N. (2004): Untersuchung von Donausedimenten und Schwebstoffen auf ausgewählte organische Stoffe. Umweltbundesamt, Wien
- SCHINDLER, W.; BLATTNER, H. (1961): Über Derivate des Iminodibenzyls: Iminostilben-Derivate. *Helv Chim Acta* 44: 753 - 762
- SCHMUTZ, M. (1985): Carbamazepine. In: *Handbook of experimental pharmacology*, Vol. 74: Antiepileptic drugs, Hrsg. FREY ET AL., Springer Verlag, Berlin u. a.
- SCHULTE-OEHLMANN, U. (1997): Fortpflanzungsstörungen bei Süß- und Brackwasserschnecken – Einfluß der Umweltchemikalie Tributylzinn. *Wissenschaft & Technik Verlag*, Berlin
- SCHULTZ, T. W. (1997): Tetratox: *Tetrahymena pyriformis* population growth impairment endpoint. A surrogate for fish lethality. *Toxicol Methods* 7: 289-309
- SCHWABE, U.; PAFFRATH, D. (2004): *Arzneiverordnungs-Report : aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg u. a.
- SEBASTINE, E. M.; WAKEMAN, R. J. (2003): Consumption and Environmental Hazards of Pharmaceutical Substances in the UK. *Proc Saf Environ Protect* 81(B4) : 229-235
- SIEGRIST, H. (2003): Fate of pharmaceuticals, personal care products and hormones in municipal wastewater treatment - important processes and case studies. ENVIRPHARMA European conference on pharmaceuticals in the environment. Abstract Book, Lyon
- SMITH, S. G.; GIESE, A. C. (1967): Axenic media for *Blepharisma intermedium*. *J Protozool* 14(4): 649-654
- SOGIN, M. L. (1991): Early evolution and the origin of eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev* 1: 457-463
- SPRAGUE, J. B.; FOGELS, J. (1977): Watch the y in bioassay. Environmental protection service technical report No. EPS-5-AR-77-1, Halifax, Nova Scotia, Canada : 107-118
- STAN, H.-J.; LINKERHÄGNER, M. (1992): Identifizierung von 2-(4-Chlorophenoxy)-2-methylpropionsäure im Grundwasser mittels Kapillar-Gaschromatographie mit Atomemissionsdetektion und Massenspektrometrie. *Vom Wasser* 79: 75-88

- STAN, H. J.; HEBERER, T.; LINKERHÄGNER, M. (1994): Vorkommen von Clofibrinsäure im aquatischen System - Führt die therapeutische Anwendung zu einer Belastung von Oberflächen-, Grund- und Trinkwasser? Vom Wasser 83: 57-68
- STATISTISCHES BUNDESAMT (2005): Angaben abgerufen unter [www.destatis.de](http://www.destatis.de)
- STERNEBRING, B. LIDÉN, A.; ANDERSSON, K.; MELANDER, A. (1992): Carbamazepine kinetics and adverse effects during and after ethanol exposure in alcoholics and healthy volunteers. Eur J Clin Pharmacol 43: 393-397
- STROBEN, E.; OEHLMANN, J.; FIORONI, P. (1992): The morphological expression of imposex in *Hinia reticulata* (Gastropoda: Buccinidae): a potential indicator of tributulin pollution. Mar Biol (Historical Archive) 113(4): 625-636
- STUMPF, M., TERNES, T. A., HABERER, K., BAUMANN, W. (1996A): Nachweis von natürlichen und synthetischen Östrogenen in Kläranlagen und Fließgewässern. Vom Wasser 87: 251-261.
- STUMPF, M., TERNES, T. A., HABERER, K., SEEL, P., BAUMANN, W. (1996B): Nachweis von Arzneimittelrückständen in Kläranlagen und Fließgewässern. Vom Wasser 86: 291-303.
- SWIFT, M. J.; HEAL, O. W.; ANDERSON, J. M. (1979): Decomposition in terrestrial ecosystems. Blackwell scientific publications, Oxford
- SYRACUSE PHYSPROP DATABASE. Online unter: <http://esc.syrres.com>. Abgerufen 15.01.2005
- TERNES, T. A. (1998): Occurrence of drugs in german sewage treatment plants and rivers. Water Res 32(11): 3245-3260
- TERNES, T. A.; KRECKEL, P.; MUELLER, J. (1999) : Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge. Sci. Total Environ 225, 91-99.
- TERNES, T. A. (2000A): Pharmaceuticals and metabolites as contaminants of the aquatic environment – an overview. In: KEITH, L. H., NEEDHAM, L. L. & JONES-LEPP, T. L. (Eds.): Issues in the analysis of environmental endocrine disruptors. Proceedings Volume ACS Symposium 40(1): 98-100; San Francisco, CA
- TERNES, T. A. (2000B): Rückstände von Arzneimitteln, Diagnostika und Antiseptika in Abwasser, Flüssen und Grundwasser - Eine neue Herausforderung für die Wasserwirtschaft. Habilitationsschrift, Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz
- TERNES, T. A. (2001): Pharmaceuticals as new emerging environmental contaminants. A Survey. Proceedings of the 2nd Int. Conference on Endocrine Disrupting Chemicals in Water. Minneapolis, Minnesota
- TERNES, T. A.; MEISENHEIMER, M.; WELSCH, H.; WILKEN, R.-D.; RÜCKERT, H.; BERTHOLD, G. (2001): Routes of groundwater contamination with pharmaceuticals and the removal drug residues during water treatment processes. Proceedings of the 2nd Int. Conference on Endocrine Disrupting Chemicals in Water. Minneapolis, Minnesota
- TIEFENBACHER, E. M.; HAEN, E.; PRZYBILLA, B.; KURZ, H. (1994): Photodegradation of some quinolones used as antimicrobial therapeutics. J Pharm Sci. 83(4): 463-467
- TIXIER, C.; SINGER, H.P.; OELLERS, S.; MÜLLER, S. R. (2003): Occurrence and Fate of Carbamazepine, Clofibric Acid, Diclofenac, Ibuprofen, Ketoprofen, and Naproxen in Surface Waters. Environ Sci Technol 37(6): 1061-1068
- TRIEBSKORN, R.; KÖHLER, H.-R.; FLEMMING, J.; BRAUNBECK, T.; NEGELE, R.-D.; RAHMANN, H. (1994A): Evaluation of bis(tri-*n*-butyltin)oxide (TBTO) neurotoxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) I. Behaviour, weight increase, and tin content. Aquatic Toxicol 30 : 189-197
- TRIEBSKORN, R.; KÖHLER, H.-R.; KÖRTJE, K.-H.; NEGELE, R.-D.; RAHMANN, H.; BRAUNBECK, T. (1994B): Evaluation of bis(tri-*n*-butyltin)oxide (TBTO) neurotoxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). II. Ultrastructural diagnosis and tin localization by energy filtering transmission electron microscopy (EFTM). Aquatic Toxicol 30: 199-213

- UHLER, G. C.; HUMINSKI, P. T.; LES, F. T.; FONG, P. P. (2000): Cilia-driven rotational behavior in gastropod (*Physa elliptica*) embryos induced by serotonin and putative serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). *J Exp Zool A* 286(4): 414-421
- URANIA (2000): Die große farbige Enzyklopädie Urania-Tierreich, Bd. Insekten. Urania-Verlag, Berlin
- VOLTZOW, J. (1994): Gastropoda: Prosobranchia. In: Harrison, F. W. and Kohn, A. J. (Hrsg.): *Microscopic Anatomy of invertebrates*. Volume 5. Mollusca I. John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. S. 111-252
- VOGT, C. (2003): Effekte von hormonell wirksamen Arzneimitteln auf die Zuckmücke *Chironomus riparius* und die Wasserassel *Asellus aquaticus*. Diplomarbeit an der Fachhochschule Zittau-Görlitz
- WALDOCK, M. J.; THAIN, J. E.; WAITE, M. E. (1987): The distribution and potential toxic effects of TBT in UK estuaries during 1986. *Appl Organometal Chem* 1(4): 287-301
- WALLACE, C. (1979): Notes on the Occurrence of Males in Populations of *Potamopyrgus jenkinsi*. *J Moll Stud* 45: 61-67
- WEGENER, G.; PERSIN, J.; KARRENBROCK, F.; RÖRDEN, O.; HÜBNER, I. (1999): Vorkommen und Verhalten von natürlichen und synthetischen Östrogenen und deren Konjugate in der aquatischen Umwelt. *Vom Wasser* 92: 347-360
- WENNEMALM, A. (2003): A Proposed Environmental Classification System for Medicinal Products, Part I and II. ENVIRPHARMA European Conference on Pharmaceuticals in the Environment. Abstract Book, Lyon
- WEST, C. W.; ANKLEY, G. T. (1998): A laboratory assay to assess avoidance of contaminated sediments by the freshwater oligochaete *Lumbriculus variegatus*. *Arch Environ Contam Toxicol* 35:20-24
- WHO (2005): ATC/DDD Index 2004. Online unter: <http://www.whocc.no/atcddd/>
- WEIGEL, S.; BESTER, K.; HÜHNERFUSS, H. (2001): New method for rapid solid-phase extraction of large-volume water samples and its application to non-target screening of North Sea water for organic contaminants by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatography A* 912(1): 151-161
- WIEGEL, S.; AULINGER, A.; BROCKMEYER, R.; HARMS, H.; LÖFFLER, J.; REINCKE, H.; SCHMIDT, R.; STACHEL, B.; VON TÜMPLING, W.; WANKE, A. (2004): Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries. *Chemosphere* 57(2): 107-126
- WESTON, J. J.; HUGETT, D. B.; RIMOLDI, J.; FORAN, C. M.; SLATTERY, M. (2001): Determination of fluoxetine (Prozac™) and norfluoxetine in the aquatic environment. Annual meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Baltimore, MD)
- WILLIAMS, R. W.; HERRUP, K. (1988): The Control of Neuron Number. *Ann Rev Neurosci* 11(1): 423-453
- WITTE, W. (2000): Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. *Int J Antimicrob Agents* 14(4): 321-325
- WONG, D. T.; BYMASTER, F. P.; ENGLEMAN, E. A. (1995): Prozac (fluoxetine, lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. *Life Sciences* 57(5): 411-441
- XU, S.; ZHU, B. T.; CONNEY, A. H. (2001): Stimulatory effect of clofibrate and gemfibrozil administration on the formation of fatty acid esters of estradiol by rat liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* 296(1): 188-197
- YAOITA, Y.; BROWN, D. D. (1990): A correlation of thyroid hormone receptor gene expression with amphibian metamorphosis. *Gen Dev* 4: 1917-1924
- YOSHIOKA, Y. (1985): Testing for the Toxicity of Chemicals with *Tetrahymena pyriformis*. *Sci Total Environ* 43: 149-157

- ZAKRZEWSKA, J. M.; IVANYI L. (1988): In vitro lymphocyte proliferation by carbamazepine, carbamazepine-10, 11-epoxide, and oxcarbazepine in the diagnosis of drug-induced hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol.* 82(1):110-115
- ZUCCATO, E.; CALAMARI, D.; NATANGELO, M.; FANELLI, R. (2000): Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet* 355(9217): 1789-1790
- ZÜHLKE, S. (2004): Verhalten von Phenazonderivaten, Carbamazepin und estrogenen Steroiden während verschiedener Verfahren der Wasseraufbereitung. Dissertation, Technische Universität Berlin
- ZWIENER, C.; FRIMMEL, F.H. (2000): Oxydative Treatment of pharmaceuticals in Water. *Water Res* Vol. 34, no. 6: 1881-1885

## 7. Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Jörg Oehlmann für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, die Promotion in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen.

Herrn Privatdozent Dr. Thomas Ternes danke ich herzlich für die Bereitschaft, meine Dissertation als Zweitkorrektor zu bewerten. Ihm und Herrn Dr. Dirk Löffler danke ich außerdem sehr herzlich für die sehr gute und freundschaftliche Zusammenarbeit bei der Analyse von Sediment- und Wasserproben aus meinen Experimenten.

Herrn Prof. Dr. Wilhelm Püttmann, Frau Dr. Elke Fries und Frau Cornelia Preußel von der Arbeitsgruppe Umweltanalytik der Universität Frankfurt, Herrn Prof. Dr. Klaus Kümmerer, Herrn Dr. Rainer Trittler und Herrn Armin König vom Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene –Sektion Angewandte Umweltforschung– der Universität Freiburg sowie Frau Gerlinde Liepelt vom Internationalen Hochschulinstitut in Zittau danke ich ebenfalls sehr herzlich für ihre Mitarbeit und Hilfe bei der analytischen Untersuchung von Proben aus meinen Experimenten.

Herrn Dr. Matthias Oetken danke ich für die Anleitung beim Erlernen der Arbeitstechniken und für die zahlreichen Gespräche und Diskussionen. Viele der Ideen, die sich daraus ergeben haben, sind in diese Arbeit eingeflossen.

Frau Dr. Ulrike Schulte-Oehlmann danke ich für ihre Hilfe bei der Arbeit mit *Potamopyrgus antipodarum*, genauso wie für ihre Ratschläge und Anregungen in den vergangenen drei Jahren. Herrn Dr. Jean Bachmann sei herzlich gedankt für seine Hilfe und alle Anregungen und Tipps, die er mir während der Promotion gegeben hat.

Dem – mittlerweile in dieser Form nicht mehr existenten – Zentrum für Umweltforschung der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main danke ich für die Finanzierung meines Projektes.

Herzlichen Dank auch an den Verein der Freunde und Förderer der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, deren Zuschuß es mir ermöglichte, die Ergebnisse meiner Dissertation auf der SETAC-North-America-Tagung 2005 in Baltimore vorzustellen.

Frau Vera Hecker danke ich für die Mitarbeit als Praktikantin und Diplomandin. Die hier erhobenen Daten haben wesentlichen Anteil daran, zu einer realistischen Beurteilung von Pharmaka in der Umwelt zu gelangen. Herrn Marc Hasenbank und Herrn Thomas Hengstebeck danke ich für ihre Mitarbeit während ihrer Praktika. Ihre Hilfe hatte großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Herr Christian Vogt hat mir dabei geholfen, meine Daten statistisch auszuwerten. Herzlichen Dank hierfür, es war gut, einen erfahrenen Dompqueur für die störrischen Programme Prism und stateasy mit ihrem ausgeprägten Eigenleben zu haben.

Frau Gabriele Elter, Frau Claudia Nesselhauf und Frau Simone Ziebarth, den Technischen Assistentinnen unserer Arbeitsgruppe, danke ich für ihre Hilfe bei der Pflege der Tierzuchten und dafür, dass ich mich immer auf sie verlassen konnte, wenn es galt, Material zu bestellen. Außerdem danke ich ihnen für ihr Verständnis, wenn sie ein von mir abends spät verlassenes Labor wieder einmal im naturgewollten Zustand größtmöglicher Entropie vorfanden ...

Frau Patrizia DiBenedetto, Frau Maren Heß, Frau Anette Schaat, Frau Claudia Schmitt, Herrn Martin Wagner, Frau Gertraud Wirzinger, Herrn Cornelius Brandelik, Herrn Jonas Baumann, Herrn Joao Diogo Batadeiro, Herrn Lukas Jagodzinski, Herrn Christian Vogt, Herrn Martin Wagner und allen andern Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die gemeinsame Zeit, die Gespräche, Feiern und allen Spaß, den wir zusammen hatten. Leute, es war eine unvergesslich schöne Zeit mit euch, ich werde immer an euch denken!

Allen, die mir bei der Korrektur dieser Arbeit geholfen haben, herzlicher Dank für Ihre Mühe mit dem anfangs doch leicht urknallartigen Werk.

Meiner Familie danke ich für alle ihre Unterstützung während meines Studiums.

Meiner Frau, Olga, danke ich für ihr Verständnis für meine häufige physische und psychische Abwesenheit in diesen Jahren. Ihre Liebe und Zuneigung haben mich in diesen drei Jahren begleitet und mir geholfen, diese Arbeit durchzuführen.



## 8. Lebenslauf



NAME: Gerrit Nentwig  
ADRESSE: Thudichumstraße 16,  
60489 Frankfurt am Main  
GEBURTSDATUM: 09. November 1974  
FAMILIENSTAND: verheiratet

### AUSBILDUNG

Grundschule: Ludwig Richter-Schule in Frankfurt am Main von 1981 bis 1985.

Weiterführende Schule: Ziehen-Gymnasium in Frankfurt am Main von 1985 bis 1994.

Abitur mit den Leistungskursen Biologie und Geschichte, weitere Prüfungsfächer Deutsch und evangelische Religion. Abiturnote: 1,1. Die Prüfung in Biologie wurde mit 13 Punkten bewertet, die Prüfung in Geschichte mit 14 Punkten.

### ZIVILDIENTST

Von Juli 1994 bis September 1995 in der evangelischen Emmausgemeinde. Vornehmliche Aufgabe war die Betreuung hilfsbedürftiger älterer Mitbürger, außerdem handwerkliche Hilfsarbeiten in der Gemeinde.

### STUDIUM UND WISSENSCHAFTLICHE ARBEIT

Biologiestudium ab dem Wintersemester 1995/1996 an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt am Main.

Vordiplomsprüfung am 30. September 1997 mit der Gesamtnote „gut“.

Diplomarbeit von Mai bis Dezember 2000 bei der ECT Ökotoxikologie GmbH über eine „Vergleichende Untersuchung der Wirkung von Carbendazim in einem Modellökosystem und im Freiland“ Prüfungsnote: „gut“

Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft am Zoologischen Institut der Universität Frankfurt am Main von 2000-2001. Teilnahme am Ringtest „Xenopus-Metamorphosis-Assay“ als wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof. Dr. Jörg Oehlmann von 2001-2002.

Wissenschaftliche Arbeit über die Effekte von Medikamentenrückständen in der aquatischen Umwelt von Juli 2002 bis Januar 2005. Anfertigung der Dissertation ab März 2005.

## MEINE AKADEMISCHEN LEHRER

Prof. Dr. Wolf Aßmus  
Dr. Hans-Joachim Ballach  
Prof. Dr. Jürgen Bereiter-Hahn  
Prof. Dr. Kurt Brändle  
Prof. Dr. Wolfgang Brüggemann  
Prof. Dr. Theodor Butterfaß  
Prof. Dr. Hans-Ulrich Chun  
Dr. Horst Deitinghoff  
Prof. Dr. Joachim Engels  
Prof. Dr. Karl-Dieter Entian  
Prof. Dr. Hugo Fasold  
Prof. Dr. Jürgen Feierabend  
Prof. Dr. Ulrich Gerhardt  
Prof. Dr. Werner Gnatzy  
Dr. Karl Hainer  
Prof. Dr. Heinz Hänel  
Prof. Dr. Horst Heydtmann  
Prof. Dr. Wilhelm Hilgenberg  
Dr. Thomas Knacker  
Prof. Dr. Nikolaus Koeniger  
Prof. Dr. Achim Kröger

Prof. Dr. Horst Lange-Bertalot  
Prof. Dr. Ulrich Maschwitz  
Prof. Dr. Dietrich Mebs  
Prof. Dr. Lutz Nover  
Prof. Dr. Jörg Oehlmann  
Prof. Dr. Heinz-Dieter Osiewacz  
Prof. Dr. Roland Prinzinger  
Prof. Dr. Rainer Protsch von Zieten  
Prof. Dr. Jürgen Rheinlaender  
Prof. Dr. Bernd Schierwater  
Dr. Günter Schmalzing  
Prof. Dr. Reinhard Schmidt  
Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz  
Prof. Dr. Bruno Streit  
Prof. Dr. Thomas Tittizer  
Dr. Michael Türkay  
Dr. Roswitha Wiltschko  
Prof. Dr. Wolfgang Wiltschko  
Prof. Dr. Christian Winter  
Prof. Dr. Herbert Zimmermann

## EHRENÄMTER

Seit 1994 Schriftführer und Geschäftsstellenverwalter im Frankfurter Fischereiverein von 1875 e. V. Ab 1989 ehrenamtliche Mitarbeit in der Evangelischen Emmausgemeinde , unter anderem in der Redaktion der Gemeindezeitung sowie als Mitglied in Kirchenvorstand und Dekanatssynode. Ab 2003 Prädikant (ehrenamtlicher Laienprediger). Von 1997 bis 2001 Mitglied des Ortsbeirates IX in Frankfurt, zuständig für die Stadtteile Dornbusch, Eschersheim, Ginnheim.

Frankfurt/Main, 21.02.2006